

Philipps



Universität  
Marburg

Philipps-Universität Marburg  
Fachbereich Biologie  
- Genetik -

**Mechanismen der Erkennung der kleinen GTPasen Cdc42 und Rac1  
durch Guanin-Nukleotid-Austausch-Faktoren in *U. maydis***

Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften  
(Dr.rer.nat.)

dem  
Fachbereich Biologie  
der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

**Britta Anna Maria Tillmann**

aus Arnsberg

Marburg/Lahn 2013

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation  
am 03.09.2013 angenommen.

Erstgutachter: Prof. Dr. M. Bölker

Zweitgutachter: Prof. Dr. Hans-Ulrich Mösch

Tag der mündlichen Prüfung am: 27.09.2013

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen wurden vom September 2008 bis Juni 2013 am Institut für Genetik der Philipps-Universität Marburg unter der Leitung von Prof. Dr. Michael Bölker durchgeführt.

Teile dieser Arbeit sind in den folgenden Artikeln veröffentlicht:

Tillmann, B., Schink, K.O. and Bölker, M.

The RhoGEFs Hot1 and TUBA uses a novel mechanism for GTPase recognition.

(in Vorbereitung)

**Für meine Familie**



# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b>	<b>2</b>
<b>Summary</b>	<b>4</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>6</b>
1.1 Kleine GTP-bindende Proteine . . . . .	6
1.1.1 Regulation von kleinen GTPasen . . . . .	6
1.2 Struktur von kleinen GTPasen . . . . .	8
1.2.1 Die kleine GTPase Cdc42 . . . . .	10
1.2.2 Die kleine GTPase Rac1 . . . . .	11
1.3 Regulation von kleinen GTPasen durch Guanin-Nukleotid-Austausch-Faktoren .	12
1.3.1 Regulation von RhoGEFs . . . . .	15
1.3.2 Protein-Lipid-Interaktionen und Erkennung von Membrankrümmungen .	15
1.4 <i>Ustilago maydis</i> als Modellorganismus . . . . .	20
1.4.1 Der Lebenszyklus von <i>Ustilago maydis</i> . . . . .	20
1.4.2 Die Rolle von kleinen GTPasen in <i>Ustilago maydis</i> . . . . .	22
1.4.3 RhoGEFs in <i>Ustilago maydis</i> . . . . .	23
1.4.4 Spezifitätsdetermination von kleinen GTPasen in <i>Ustilago maydis</i> . . . . .	25
1.5 Zielsetzung . . . . .	26
<b>2 Ergebnisse</b>	<b>28</b>
2.1 Charakterisierung des Rho-GEFs Hot1 in <i>U. maydis</i> . . . . .	28
2.1.1 Hot1 lokalisiert an der zukünftigen Knospungsstelle und am " <i>Mother-Bud-Neck</i> " . . . . .	28
2.1.2 Die Überexpression von Hot1 supprimiert den Zellteilungsdefekt von $\Delta don1$ Mutanten . . . . .	32
2.1.3 Hot1 dimerisiert mit dem BAR-Domänen Protein Hob3 . . . . .	34
2.1.4 Eine Deletionsmutante von Hob3 zeigt einen verzögerte Zellteilung . . . . .	37
2.2 Der RhoGEF Hot1 diskriminiert mittels eines neuen Spezifitätsmechanismus zwischen Cdc42 und Rac1 . . . . .	39
2.2.1 Isolierung von rekombinanten GTPasen und GEFs . . . . .	39
2.2.2 Hot1 ist ein Cdc42- und Rac1- spezifischer GEF . . . . .	41
2.2.3 Die Aminosäure an Position 56 in Cdc42 und Rac1 hat keinen Einfluss auf die GTPase-Spezifität von Hot1 . . . . .	42

2.2.4	Bestimmung der spezifitätsbestimmenden Region von Cdc42 für den GEF Hot1 . . . . .	43
2.2.5	Der humane RhoGEF TUBA benutzt einen ähnlichen Determinationsmechanismus wie der RhoGEF Hot1 . . . . .	51
2.2.6	Kristallisationsversuch der katalytischen DH-Domäne von Hot1 . . . . .	52
2.2.7	Die Deletion der Insertion der katalytischen Domäne von Hot1 führt zu einem gesteigerten Nukleotid-Austausch an Rac1 . . . . .	54
2.3	Signalspezifität wird durch ein Zusammenspiel von Aktivatoren, GTPasen und Effektoren erreicht . . . . .	57
2.3.1	Die chimäre GTPase C157R kann sowohl von Cdc42- als auch von Rac1-spezifischen GEFs aktiviert werden . . . . .	58
2.3.2	Die chimäre GTPase C157R kann die Deletionsphänotypen von Cdc42 und Rac1 komplementieren . . . . .	58
2.3.3	Die Lokalisation einer GTPase ist wichtig für die Signalspezifität . . . . .	60
2.3.4	Die Rolle der Aminosäure an Position 56 für die Funktion der chimären GTPase C157R . . . . .	65
2.3.5	Die Signalspezifität von Cdc42 während der Zellteilung wird neben der GEF-GTPase Interaktion auch von der GTPase-Effektor Interaktion bestimmt . . . . .	67
<b>3</b>	<b>Diskussion</b>	<b>69</b>
3.1	Die Regulation der Zellmorphologie durch Hot1 . . . . .	69
3.1.1	BAR-Domänen als Membran-bindende und Membran-formende Protein-Komponenten . . . . .	71
3.2	Der RhoGEF Hot1 benutzt einen neuen Mechanismus zur Erkennung von Cdc42 und Rac1 . . . . .	75
3.3	Eine Nicht-konservierte Insertion in der Hot1 DH-Domäne als spezifitätsregulierendes Motiv . . . . .	80
3.4	Spezifische Signalweiterleitung in komplexen Signalkaskaden . . . . .	82
<b>4</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>92</b>
4.1	Bakterien- und Hefestämme . . . . .	92
4.1.1	Bakterienstämme . . . . .	92
4.1.2	Hefestämme . . . . .	92
4.1.3	<i>Ustilago maydis</i> -Stämme . . . . .	92
4.2	Plasmide und Primer . . . . .	93
4.2.1	Standard-Plasmide . . . . .	93
4.2.2	In dieser Arbeit hergestellten Stämme . . . . .	94
4.2.3	Plasmide für die Transformation von <i>U. maydis</i> . . . . .	97
4.2.4	Plasmide für die Produktion von rekombinanten Proteinen in <i>E. coli</i> . . .	110
4.2.5	Allgemeine Materialien . . . . .	118
4.2.6	Kits . . . . .	119

## Inhaltsverzeichnis

4.2.7	Chemikalien . . . . .	119
4.2.8	Enzyme . . . . .	121
4.3	Puffer und Lösungen . . . . .	122
4.3.1	Antibiotika . . . . .	122
4.3.2	Lösungen für die Plasmidisolierung mittels "Alkalischer Lyse" . . . . .	122
4.3.3	Lösungen für die Agarose-Gelelektrophorese . . . . .	122
4.3.4	Southern Blot-Puffer . . . . .	123
4.3.5	Puffer für SDS-Gelelektrophorese und Western Blot . . . . .	123
4.3.6	Lösungen für die Herstellung von chemisch kompetenten Zellen . . . . .	124
4.3.7	Präparation chromosomaler DNA von <i>U. maydis</i> . . . . .	125
4.3.8	Lösungen für die Protoplasierung und Transformation von <i>U. maydis</i> . . . . .	125
4.3.9	Puffer für die Aufreinigung von Proteinen . . . . .	125
4.3.10	Puffer Gelfiltration der DH-Domäne von Hot1 . . . . .	126
4.3.11	Puffer für <i>in vitro</i> GEF-Assays . . . . .	126
4.4	Mikrobiologische Nährmedien . . . . .	126
4.4.1	Nährmedien für die Kultivierung von <i>U. maydis</i> . . . . .	126
4.4.2	Nährmedien für die Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i> . . . . .	128
4.4.3	Nährmedien für die Kultivierung des Bakteriums <i>E. coli</i> . . . . .	129
4.5	Kultivierung von Mikroorganismen . . . . .	130
4.5.1	Kultivierung von <i>Escherichia coli</i> . . . . .	130
4.5.2	Langzeitlagerung von <i>E. coli</i> . . . . .	130
4.5.3	Kultivierung von <i>U. maydis</i> . . . . .	130
4.5.4	Langzeitlagerung von <i>U. maydis</i> . . . . .	131
4.5.5	Kultivierung von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . . . . .	131
4.5.6	Langzeitlagerung von <i>S. cerevisiae</i> . . . . .	131
4.6	Molekularbiologische Techniken . . . . .	131
4.6.1	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> im analytischen Maßstab . . . . .	131
4.6.2	Restriktionsenzymatische Spaltung von DNA . . . . .	132
4.6.3	Dephosphorylierung von geschnittener Plasmid-DNA . . . . .	132
4.6.4	Agarose-Gelelektrophorese . . . . .	132
4.6.5	Extraktion von DNA aus Agarosegelen . . . . .	132
4.6.6	Ligation von DNA-Fragmenten . . . . .	133
4.6.7	Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen . . . . .	133
4.6.8	Transformation von chemisch kompetenten <i>E. coli</i> -Zellen mit Plasmid-DNA . . . . .	133
4.6.9	Polymerase-Kettenreaktionen (PCR) . . . . .	133
4.6.10	Präparation von chromosomaler DNA aus <i>Ustilago maydis</i> . . . . .	134
4.6.11	DNA-Sequenzierung . . . . .	134
4.6.12	Transfer und Detektion von DNA auf Membranen (Southern Blot) . . . . .	134
4.6.13	Herstellung von radioaktiv markierten Sonden . . . . .	135
4.6.14	Transformation von <i>S. cerevisiae</i> mit Plasmid-DNA . . . . .	135
4.6.15	Protoplastierung von <i>U. maydis</i> . . . . .	136
4.6.16	Transformation von <i>U. maydis</i> -Protoplasten . . . . .	136

## Inhaltsverzeichnis

4.6.17	Genetische Modifikation von <i>U. maydis</i> . . . . .	136
4.6.18	Integration von Vektoren in den genomischen <i>ip</i> -Locus . . . . .	138
4.7	Produktion und Aufreinigung von rekombinanten Proteinen . . . . .	139
4.7.1	Produktion von rekombinanten Rho-Proteinen . . . . .	139
4.7.2	Aufreinigung von Rho-GTPasen aus <i>E.coli</i> . . . . .	140
4.7.3	Produktion und Aufreinigung von rekombinanten Rho-GEFs aus <i>E.coli</i> .	140
4.7.4	Produktion und Aufreinigung der Hot1 DH-Domäne aus <i>E.coli</i> für die Kristallisationsversuche . . . . .	140
4.8	Analyse von Proteinen . . . . .	142
4.8.1	Proteinextraktion aus <i>U.maydis</i> . . . . .	142
4.8.2	Konzentrationsbestimmung . . . . .	142
4.8.3	SDS-Gelelektrophorese . . . . .	142
4.8.4	Transfer und Nachweis von Proteinen auf PVDF-Membranen (Western Blot)	143
4.8.5	Gesamtproteinnachweis durch Anfärben des SDS-Geles . . . . .	144
4.8.6	Analyse von Protein-Protein-Interaktionen mittels GST <i>pulldown assays</i> .	144
4.9	<i>In vitro</i> -Untersuchung von Rho-Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren . . . . .	145
4.10	Zellbiologische Untersuchung von <i>U. maydis</i> . . . . .	146
4.10.1	Mikroskopie von <i>U. maydis</i> -Zellen . . . . .	146
4.10.2	Zellwandfärbung . . . . .	146
<b>Literaturverzeichnis</b>		<b>148</b>
<b>Abkürzungen</b>		<b>165</b>
<b>Danksagung</b>		<b>168</b>
<b>Eidesstattliche Erklärung</b>		<b>169</b>

# Abbildungsverzeichnis

1.1	Zyklus zur Aktivierung und Inaktivierung von kleinen GTPasen . . . . .	7
1.2	Aufbau des aktiven Zentrums einer kleinen GTPasen . . . . .	8
1.3	Schematischer Aufbau der Proteine der Rho-Familie . . . . .	9
1.4	Kristallstruktur des RhoGEFs Tiam1 in Komplex mit Rac1 . . . . .	13
1.5	Die Interaktion der BAR-Domäne mit schwach und stark gekrümmten Membranen	17
1.6	Struktur der amphipathischen Helix von Amphiphysin aus <i>Drosophila melanogaster</i>	18
1.7	Kristallstruktur der BAR-Domänen von Rac-gebundenem Arfaptin2 und Amphiphysin . . . . .	19
1.8	Der Lebenszyklus von <i>U. maydis</i> . . . . .	21
1.9	Morphologie von <i>cdc42</i> - und <i>rac1</i> -Mutanten in <i>U. maydis</i> . . . . .	23
1.10	RhoGEFs der Dbl-Familie in <i>U. maydis</i> . . . . .	24
1.11	Kleine GTPasen fungieren als molekulare Schalter in komplexen Netzwerken . . .	26
2.1	Vergleich der homologen BAR-Domänen GEFs aus <i>Homo sapiens</i> , <i>Ustilago maydis</i> und <i>Schizosaccharomyces pombe</i> . . . . .	29
2.2	Charakterisierung des RhoGEFs Hot1 in <i>U. maydis</i> . . . . .	31
2.3	Suppression des Zelltrennungsdefektes von $\Delta don1$ -Mutanten durch Hot1 . . . . .	33
2.4	Dimerisierungsversuche der BAR-Domänen Proteine Hot1, Hob1 und Hob3 . . .	36
2.5	Charakterisierung der BAR-Domänen Proteine Hob1 und Hob3 . . . . .	38
2.6	Schematische Darstellung eines <i>in vitro</i> GEF Assays . . . . .	40
2.7	Aufreinigung von kleinen GTPasen und Dbl-Proteinen aus <i>E. coli</i> . . . . .	41
2.8	<i>In vitro</i> GEF-Aktivität von Hot1 . . . . .	42
2.9	Die Aminosäure an Position 56 in Cdc42 hat keinen Einfluss auf die Spezifitätsdetermination von Hot1 . . . . .	44
2.10	Eingrenzung der spezifitätsbestimmenden Region von Cdc42 für den RhoGEF Hot1	47
2.11	<i>In vitro</i> GEF-Aktivität von Hot1, Cdc24 und Don1 gegenüber chimären GTPases	48
2.12	Hot1 aktiviert die chimären GTPasen C45R und C45R70C <i>in vivo</i> . . . . .	50
2.13	Die C-terminale Region von Rac1 ist wichtig für die Aktivierung durch Hot1 . .	51
2.14	GEF-Aktivität des humanen RhoGEFs TUBA . . . . .	52
2.15	Kristallisationsversuch der katalytischen DH-Domäne von Hot1 . . . . .	53
2.16	Die Deletion der Insertion der katalytischen DH-Domäne von Hot1 führt zu einem gesteigerten Nukleotid-Austausch an Rac1 . . . . .	55
2.17	Die Überexpression der Hot1 $\Delta^{AA1216-1406}$ -Mutante führt zu einer abnormalen Zellmorphologie . . . . .	56

2.18	Die chimäre GTPase C157R kann sowohl von Cdc42- als auch von Rac1- spezifischen GEFs aktiviert werden . . . . .	58
2.19	Die Expression der chimären GTPase C157R kann die Deletionsphänotypen von sowohl Cdc42 als auch Rac1 komplementieren . . . . .	59
2.20	Die chimäre GTPase C157R ist in der Lage, den Filamentphänotyp der Deletionsmutanten von sowohl Cdc42 als auch Rac1 zu supprimieren . . . . .	61
2.21	Die verschiedenen GTPase zeigen unterschiedliche intrazelluläre Lokalisationen ihrer C-terminalen Regionen . . . . .	63
2.22	Die verschiedenen GTPase zeigen unterschiedliche intrazelluläre Lokalisationen .	64
2.23	Die Aktivierung der chimären GTPase C157R durch Hot1 ist unabhängig von der spezifitätsdeterminierenden Aminosäure Phe56 . . . . .	66
2.24	Der Aminosäureaustausch an Position 56 in Rac1 führt zu einem Wechsel der GTPase-Effektor-Interaktion . . . . .	68
3.1	Modell der möglichen Funktion von BAR-Domänen-Proteinen bei der Clathrin-vermittelten Endozytose . . . . .	73
3.2	Prognose einer N-terminalen amphipathischen Helix für Hob1, Hob3 und Hot1 .	74
3.3	Strukturelle Grundlage der spezifischen Erkennung von Cdc42 und Rac1 durch verschiedene RhoGEFs . . . . .	77
3.4	Eingrenzung der spezifitätsbestimmenden Region von Cdc42 für Hot1 . . . . .	79
3.5	Mechanismen zur Generierung von Signalspezifität in komplexen Netzwerken . .	83
3.6	Sequenzvergleich der beiden GTPasen Cdc42 und Rac1 in <i>U. maydis</i> . . . . .	86
4.1	Konstruktion der Deletion der Insertionsregion innerhalb der katalytischen Domäne von Hot1 . . . . .	107
4.2	Konstruktion der chimären GTPasen . . . . .	114
4.3	Genetische Modifikationen von <i>U. maydis</i> . . . . .	137
4.4	Integration von Plasmiden in den genomischen <i>ip</i> -Locus . . . . .	139

# Zusammenfassung

Kleine GTPasen der Rho-Familie übernehmen die Funktion von molekularen Schaltern in komplexen Signal-Netzwerken, die eine Vielzahl unterschiedlicher Signalkaskaden miteinander verknüpfen und selektive Signalantworten erlauben. Gleichzeitig nehmen auch die Regulatoren der molekularen Schalter eine wichtige Rolle ein, da durch diese Proteine die spezifische Weiterleitung von Signalen sichergestellt wird. Weiterhin verhindern sie, dass es zu einer unspezifischen Aktivierung von multiplen Signalkaskaden kommt. In der vorliegenden Arbeit wurden mehrere Aspekte untersucht, wie in diesen komplexen Netzwerken sichergestellt wird, dass die richtige Signalantwort auf einen bestimmten Stimulus erfolgt.

Während RhoGTPasen in vielen unterschiedlichen Signalkaskaden aktiv sind, sind sowohl die regulatorischen Proteine - die GEFs und GAPs - als auch die Effektoren oftmals spezifisch für einzelne Signalwege. So gibt es deutlich mehr GEFs und Effektoren, als das es kleine GTPasen gibt. Eine GTPase kann oftmals von mehr als einem GEF aktiviert werden und ihrerseits mehr als einen Effektor aktivieren. Diese Interaktion zwischen GTPase und Effektor ist nicht immer spezifisch. Viele Effektoren können oft mit mehr als einer GTPase interagieren. Es stellt sich also die Frage, wie sichergestellt wird, dass die richtige Signalantwort auf einen spezifischen Stimulus erfolgt. Während eine GTPase in einer Vielzahl unterschiedlicher Singalwegen aktiv ist, reguliert ein einzelner GEF oft nur eine spezifische Funktion der jeweiligen GTPase. Um die einzelnen Funktionen einer GTPase zu verstehen, ist es somit wichtig, die Komplexität zu verringern und auf einzelne Signalwege zu reduzieren.

In der vorliegenden Arbeit wurde der RhoGEF Hot1 aus *U. maydis* näher charakterisiert. Hot1 ist ein untypischer RhoGEF, der anstelle des für RhoGEFs charakteristischen Domänen-Motivs, bestehend aus katalytischer DH-Domäne und membranbindender PH-Domäne, eine DH-Domänen-assoziierte BAR-Domäne besitzt. Es konnte gezeigt werden, dass Hot1 als RhoGEF für Cdc42 wirken kann und an der Regulation der Zellmorphologie beteiligt ist. Hot1 hat damit eine komplementäre Funktion zum RhoGEF Don1, der die Cdc42-abhängige Zelltrennung reguliert. Die für einen RhoGEF ungewöhnliche BAR-Domäne von Hot1 erkennt spezifische Membrankrümmungen. Es konnte gezeigt werden, dass Hot1 an frühen endozytotischen Strukturen lokalisiert. Darüber hinaus bildet die BAR-Domäne von Hot1 Heterodimere mit dem BAR-Domänen Protein Hob3. Für dieses Protein konnte demonstriert werden, dass es an der frühen Endozytose und an der Zytokinese beteiligt ist.

Neben dieser zellbiologischen Einordnung von Hot1 lag der Schwerpunkt dieser Arbeit darauf, zu untersuchen, wie Hot1 spezifisch sein Substrat, die GTPase Cdc42, erkennt. Die beiden GTPasen Cdc42 und Rac1 weisen einen hohen Grad an Sequenzähnlichkeit auf. Dennoch führt eine Deletion dieser Proteine in *U. maydis* zu unterschiedlichen Phänotypen. Dies deutet darauf hin, dass Cdc42 und Rac1 Funktionen in unterschiedlichen Signalkaskaden übernehmen. In früheren

Arbeiten konnte gezeigt werden, dass einige RhoGEFs zwischen Cdc42 und Rac1 anhand einer einzigen konservierten Aminosäure an Position 56 unterscheiden. Ein Austausch dieser Aminosäure zwischen Cdc42 und Rac1 führt zu einer Änderung der Spezifität der Cdc42-spezifischen RhoGEFs Don1 und Its1 sowie des Rac1-spezifischen RhoGEFs Cdc24 in *U. maydis*. Auch aus anderen Organismen war bekannt, dass die Aminosäure an Position 56 eine wichtige Rolle für die spezifische Erkennung von Cdc42 und Rac1 durch RhoGEFs spielt. Überraschenderweise hat diese Aminosäure keinen Einfluss auf die Erkennung von Cdc42 durch Hot1. Vielmehr konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass Hot1, aber auch das humane Homolog TUBA, einen neuen Mechanismus benutzen, um zwischen Cdc42 und Rac1 zu unterscheiden. Anstatt der Aminosäure 56, erkennt Hot1 die GTPase Cdc42 anhand weniger unterschiedlicher Aminosäuren im N-Terminus von Cdc42.

Als weiterer Punkt dieser Arbeit wurde untersucht, wie die spezifische Signalweiterleitung von kleinen GTPasen in komplexen Signalkaskaden funktioniert. Aufgrund der hohen Ähnlichkeit von Cdc42 und Rac1 und der teilweisen Redundanz ihrer Funktionen stellte sich die Frage, in wie weit diese GTPasen noch gemeinsame Funktionen übernehmen können und ob es zwangsläufig beide Proteine geben muss. Es konnte eine synthetische GTPase generiert werden, die zu großen Teilen die Funktionen von Cdc42 und Rac1 in einem Protein vereint. Diese GTPase kann von den meisten bekannten RhoGEFs von Cdc42 und Rac1 aktiviert werden und auch die meisten zellulären Funktionen übernehmen. Im Zuge dieser Untersuchungen konnte auch gezeigt werden, dass es einen spezifischen Effektor von Cdc42 geben muss, der, ähnlich wie viele RhoGEFs, auch anhand der Aminosäure an Position 56 zwischen Cdc42 und Rac1 unterscheidet. Schließlich konnte noch gezeigt werden, dass die C-terminale Region von Cdc42 und Rac1 einen wichtigen Einfluss auf die subzelluläre Lokalisation der GTPasen hat und dass diese Lokalisation kritisch für die korrekte Funktion dieser Proteine ist. Diese Lokalisation ist wichtig für die korrekte Signalweiterleitung, da ein Bereich des C-Terminus, die sogenannte polybasische Region, die GTPase in bestimmten Subdomänen der Membran konzentrieren kann und darüber die Aktivität dieser GTPase auf bestimmte Subkompartimente beschränkt.



# Summary

All cells contain complex molecular signaling networks. Small GTPases of the Rho family act as molecular switches in these networks. They link different signaling cascades and enable the cell to react selectively to different stimuli. The regulators of these molecular switches play an important part, since they guarantee the selective transmission of signals. Moreover, they also restrict the unselective activation of multiple signaling cascades.

The work presented here investigates how it can be ensured that in complex signaling networks only specific signal responses are elicited by a certain stimulus. While RhoGTPases can act in multiple signaling pathways, both their regulatory proteins - GEFs and GAPs - and their effectors are often specific for single signaling pathways. This is highlighted by the fact that there are more GEFs and effectors than RhoGTPases, and that a single GTPase can be activated by multiple GEFs and signal through multiple effectors. Moreover, the interaction between GTPase and effector is not always highly specific, since many effectors can be activated by more than one GTPase. This poses the question how it can be guaranteed that a certain stimulus results in a specific response. An important part of this specificity is mediated by the activators of small GTPases, the GEFs. A GTPase can act in multiple different signaling pathways; however, many GEFs regulate a GTPase only in the context of a specific pathway or a specific function. Therefore, in order to understand the role of a GTPase in complex signaling networks, it is often necessary to reduce this complexity and analyze their role in single signal transduction pathways, for example by analyzing rather the function of the pathway-specific GEFs than the more universal GTPases.

This work characterizes the function of the RhoGEF Hot1 in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. Hot1 is an atypical RhoGEF which contains a catalytic DH domain in combination with a BAR domain instead of the canonical combination of catalytic DH domain and membrane-associated PH domain. In the work presented here it could be shown that Hot1 acts as a RhoGEF for Cdc42 and is involved in the regulation of cellular morphology. Hot1 acts as a complimentary factor to the GEF Don1, which regulates the Cdc42-dependent cell separation. The BAR domain of Hot1, an unusual feature for RhoGEFs, is able to recognize membranes with a specific curvature, and localizes Hot1 to early endocytic structures. This is probably achieved by the ability of the Hot1 BAR domain to form heterodimers with the BAR Domain protein Hob3, a regulator of early endocytosis and cell division.

A main goal of this study was to investigate how Hot1 is able to specifically recognize its substrate, the GTPase Cdc42. Cdc42 and the closely related GTPase Rac1 show a high degree of sequence similarity, yet they appear to have functions in distinct signaling cascades since their deletion causes completely different phenotypes. In earlier works, it was shown that a number of RhoGEFs distinguishes between Cdc42 and Rac1 by a single amino acid at position 56 of

## Summary

these GTPases. The exchange of this residue between Cdc42 and Rac1 results in a changed recognition by the Cdc42-specific GEFs Don1 and Its1 and the Rac1-specific GEF Cdc24 in *U. maydis*. Also from other organisms it is known that the amino acid 56 is crucial for the specific recognition of Cdc42 and Rac1 by their respective RhoGEFs. Notably, this amino acid plays no role for the specific recognition of Cdc42 by Hot1. As the here presented work demonstrates, Hot1, but also its mammalian homolog TUBA, recognizes Cdc42 by virtue of several specific amino acids at the N-terminus of Cdc42. Another aspect addressed by the work presented here is the question how specific signal transduction by small GTPases can be achieved in complex signaling networks. Cdc42 and Rac1 show a high degree of sequence similarity and have partially redundant functions. This poses the question which common functions these two proteins have and if there is a requirement that both proteins need to exist. In the course of this work, it was possible to generate a synthetic GTPase that embodies the functions of Cdc42 and Rac1 in a single protein. This GTPase can be activated by nearly all known GEFs for Cdc42 and Rac1 and can also replace Cdc42 and Rac1 in the majority of their cellular functions.

Finally, it could be shown that the C-terminal region of Cdc42 and Rac1 is critical for the subcellular localization of these GTPases and is also required for the correct function of these proteins. This specific subcellular localization is critical for the correct signal transduction since an area of the C-terminus, the polybasic region, concentrates Cdc42 and Rac1 in certain subdomains of the membrane and thereby restricts and focusses the activity of these GTPases.

# 1 Einleitung

## 1.1 Kleine GTP-bindende Proteine

In eukaryotischen Zellen existieren zahlreiche verschiedene Signalkaskaden, welche die Zellen dazu befähigen, auf endo- und exogene Stimuli zu reagieren und diese weiterzuleiten. Innerhalb dieser Signalkaskaden übernehmen GTP-bindende Proteine die Rolle von molekularen Schaltern, deren Aktivierungszustand durch die Bindung und Hydrolyse von GTP gesteuert wird. Es wird zwischen zwei Klassen von GTP-bindenden Proteinen unterschieden: Zum einen gibt es die heterotrimeren G-Proteine. Dabei handelt es sich um Membran gebundene Proteine, die aus drei Untereinheiten,  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ , bestehen und in der Regel direkt mit Rezeptorproteinen gekoppelt sind (Bourne, 1997). Diese Proteine spielen eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion, insbesondere in der Wahrnehmung von externen Stimuli. Des Weiteren existieren die als Monomere vorliegenden kleinen GTP-bindenden Proteine, die auch als kleine GTPasen bezeichnet werden. Kleine GTPasen sind im GTP-gebundenen Zustand aktiv. In diesem Zustand können sie mit Effektorproteinen interagieren und diese aktivieren. Im GDP-gebundenen Zustand sind kleine GTPasen dagegen inaktiv. Die Superfamilie der kleinen GTPasen enthält über 100 Mitglieder. Diese wird aufgrund ihrer verschiedenen Funktionen in der Zelle in fünf Subfamilien unterteilt (Bourne et al., 1990; Hall, 1990): Die Familie der Ras-, der Rho/Rac/Cdc42-, der Ran-, der Rab- und der Sar/Arf-ähnlichen GTPasen.

### 1.1.1 Regulation von kleinen GTPasen

Kleine GTPasen fungieren in der Zelle als molekulare Schalter und kommen in zwei unterschiedlichen Zuständen vor: in einem GTP-gebundenen aktiven Zustand und in einem GDP-gebundenen inaktiven Zustand (siehe Abb. 1.1), (Gibbs et al., 1984; Bourne et al., 1990). Es ist äußerst wichtig, die Aktivität von kleinen GTPasen streng zu regulieren, da eine erhöhte Expression oder Aktivität von kleinen GTPasen oft zu einer unkontrollierten Zellproliferation und damit zur Tumorbildung führt (Abraham et al., 2001; Hall and Nobes, 2000).

Der Regulationsmechanismus der kleinen GTPasen ist trotz ihrer unterschiedlichen zellulären Aufgaben hoch konserviert. Alle kleinen GTPasen enthalten eine Domäne, die GTP binden und zu GDP und  $P_i$  hydrolysieren kann (Bourne et al., 1991). Die Aktivität kleiner GTPasen wird hauptsächlich durch die Interaktion mit zwei Klassen von regulatorischen Proteinen kontrolliert. Die Aktivierung der GTPase erfolgt durch den Nukleotid-Austausch von GDP zu GTP. Dieser Austausch erfolgt mit der Hilfe von "Guanin-Nukleotid-Austausch-Faktoren" (GEFs), die mit hoher Affinität an die inaktive GDP-gebundene Form der GTPase binden. GEFs katalysieren die Freisetzung von GDP und stabilisieren die Nukleotid-freie Form der GTPase, wodurch sie die

## 1 Einleitung

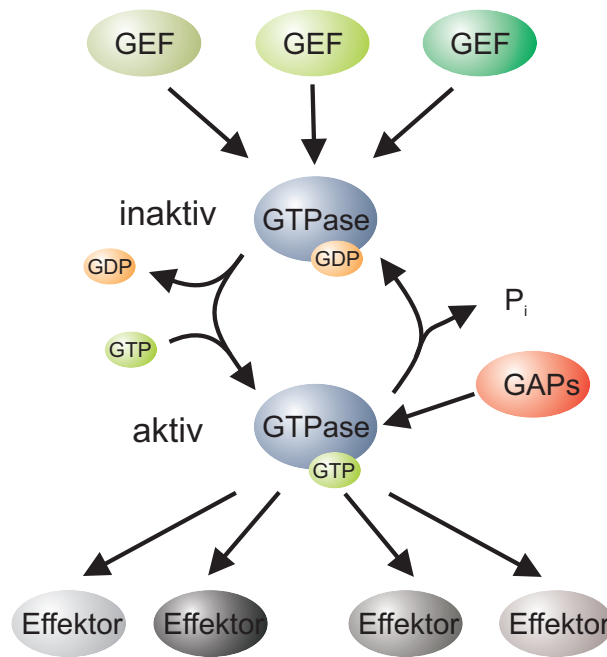


Abbildung 1.1: **Zyklus zur Aktivierung und Inaktivierung von kleinen GTPasen.**

Die inaktive GDP-gebundene Form der GTPase wird durch Interaktion mit RhoGEFs, die den Nukleotid-Austausch katalysieren, in den aktiven GTP-gebundenen Zustand überführt. Die aktive GTPase kann nun mit Effektorproteinen interagieren. Die Hydrolyse von GTP zu GDP erfolgt über die Interaktion mit RhoGAPs, die die intrinsische GTPase Aktivität stimulieren, was zur Inaktivierung der GTPase führt.

Bindung von GTP erlauben (West et al., 1990; Bourne et al., 1990). Die Freisetzung des Nukleotids ist in dieser Reaktion der geschwindigkeitsbestimmende Schritt. Der Nukleotid-Austausch von GDP zu GTP verursacht eine Konformationsänderung der GTPase (siehe Abb. 1.2). Diese Konformationsänderung führt zu einer verringerten Affinität zum GEF, erhöht allerdings die Affinität zu spezifischen Effektorproteinen. Diese können an die aktiven GTPasen binden und dadurch aktiviert werden. Effektoren der kleinen GTPasen sind an einem vielseitigem Spektrum zellulärer Reaktionen beteiligt (Bourne et al., 1990, 1991).

Entgegen ihrer Bezeichnung als kleine GTPasen besitzen GTP-bindende Proteine der Ras-Superfamilie nur eine schwache intrinsische GTPase Aktivität. Diese schwache GTPase-Aktivität kann aber durch die Interaktion mit sogenannten "GTPase activating proteins" (GAPs) stimuliert werden (Bourne et al., 1990; Cales et al., 1988).

Viele GTPasen besitzen zusätzliche C-terminale Strukturen, die als Signal für eine posttranslationale Lipidmodifikation dienen (siehe auch Abschnitt 1.2). Eine solche Prenylierung bewirkt eine Verankerung der GTPase in der Zytoplasmamembran und stellt ein wichtiges Element der räumlichen Regulation von kleinen GTPasen dar (Glomset and Farnsworth, 1994; Zhang and Casey, 1996).

Im Fall der Rho- und Rab- ähnlichen GTPasen gibt es eine weitere Klasse regulatorischer Proteine, die sogenannten "Guanine Nucleotide Dissociation Inhibitors" (GDIs). Diese Proteine können membrangebundene GTPasen aus der Membran herauslösen und sind so an der Regulation der intrazellulären Lokalisierung dieser Proteine beteiligt (Sasaki et al., 1990). GDIs besitzen eine

hydrophobe Bindetasche, über welche sie mit der C-terminalen Prenylmodifikation der GTPase interagieren und die GTPase aus der Membran herauslösen. Die GDI-gebundenen GTPasen liegen in der GDP-gebundenen, inaktiven Form im Zytoplasma vor. Die Ablösung der GDIs aus dem zytosolischen Komplex mit der inaktiven GTPase erfolgt durch GDI-Dissoziationsfaktoren wie z.B. den ERM (Ezrin, Radixin, Moesin) Proteinen, die an GDIs binden und deren Aktivität verringern (Takahashi et al., 1997).

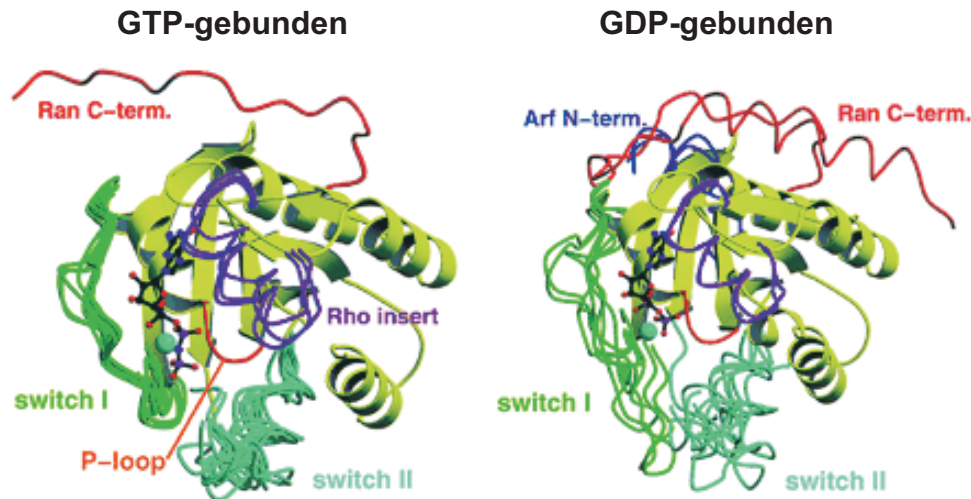


Abbildung 1.2: **Aufbau des aktiven Zentrums einer kleinen GTPasen.**

Gezeigt ist die Lage der SwitchI- und SwitchII-Regionen des aktiven Zentrums relativ zur Phosphatbindeschleife (P-loop) in der GDP- beziehungsweise GTP-gebundenen Form (Vetter and Wittinghofer, 2001).

## 1.2 Struktur von kleinen GTPasen

Die Rho-Familie bildet den am best charakterisierten Zweig der Superfamilie der kleinen GTPasen. In Säugerzellen wurden bisher 22 Mitglieder dieser Familie nachgewiesen, die in fünf Untergruppen gegliedert werden: die RhoA ähnlichen-, die Rac1 ähnlichen-, die Cdc42 ähnlichen-, die Rnd ähnlichen- und die RhoBTB ähnlichen- Proteine (Wennerberg and Der, 2004). Mitglieder der Rho-Familie sind an einer Vielfalt zellulärer Prozesse beteiligt, wie der Determination der Zellpolarität, der Endozytose, der Organisation des Aktin-Zytoskeletts oder der Regulation der Genexpression (Takai et al., 2001). Die Mitglieder dieser Familie variieren in ihrer Größe und ihrer Aminosäuresequenz, weisen aber im Hinblick auf ihr katalytisches Zentrum und ihre Struktur einen sehr ähnlichen Aufbau auf. RhoGTPasen beinhalten in ihrem aktiven Zentrum zwei sogenannte Switch-Regionen, Switch I und Switch II (siehe Abb. 1.3). Die Switch-Regionen der GTPase ändern ihre Konformation abhängig von dem Nukleotid-Bindungs-Zustand, je nachdem ob sie ein Di- oder Triphosphat gebunden haben (siehe Abb. 1.2). Während des Nukleotid-Austauschs von GDP zu GTP ändern diese beiden Switch-Regionen ihre Konformation relativ zur Phosphatbindeschleife (P-Loop). Diese bildet die Nukleotidbindestelle, welche hauptsächlich

mit dem Nukleotid in Wechselwirkung tritt. Für einen Ladungsausgleich und für eine erhöhte Affinität zur Bindung von Guanin-Nukleotiden benötigen kleine GTPasen weiterhin noch den Kofaktor Magnesium (Vetter and Wittinghofer, 2001).

Zwischen den Switch-Regionen befindet sich eine sogenannte Effektorbindeschleife, ein antiparalleles  $\beta$ -Faltblatt, welches die Interaktion mit anderen Proteinen, wie Effektormolekülen oder RhoGEFs, vermittelt. Diese Region überlagert sich teilweise mit der SwitchI-Region der GTPase (siehe Abb. 1.3).

Außerdem enthalten die kleinen GTPasen ein C-terminales sogenanntes "CAAX-Motiv" (siehe Abb. 1.3). Dieses dient als Signal für eine posttranslationale Modifikation durch eine Prenylgruppe (meist Geranyl-Geranyl- oder Farnesylreste), durch welche die kleinen GTPasen an die Membran rekrutiert werden (Adamson et al., 1992a). Viele Mitglieder der Rho-Familie besitzen noch ein weiteres Membran-lokalisierendes Signal. Bei diesem Signal handelt es sich um eine polybasische Region (PBR), die eine hohe Dichte an den positiv geladenen Aminosäuren Arginin und Lysin aufweist. Diese PBR ermöglicht den kleinen GTPasen die Assoziation mit Membranen sowie die Interaktion mit anderen Proteinen, um die GTPase an spezifische Signalkomplexe an bestimmten subzellulären Kompartimenten zu lokalisieren (Williams, 2003; Lanning et al., 2004; ten Klooster and Hordijk, 2007). Die Membranassoziation erfolgt über eine elektrostatische Wechselwirkung zwischen den positiv geladenen Aminosäuren und den negativ geladenen Phosphatköpfen der Phospholipide innerhalb der Membran und kann so die intrazelluläre Lokalisation mit beeinflussen (Jack et al., 2008; Adamson et al., 1992b; Prieto-Sanchez and Bustelo, 2003; Michaelson et al., 2001). Die PBR ist zwischen den nah verwandten GTPasen sehr variabel und ermöglicht unterschiedliche Lokalisationen von den sonst so ähnlichen GTPasen. Neben der Effektorbindeschleife spielt die PBR eine entscheidende Rolle in der Sicherstellung von Spezifität (Michaelson et al., 2001; Williams, 2003; ten Klooster and Hordijk, 2007).

Die Mitglieder der Rho/Rac/Cdc42 Familie enthalten, im Gegensatz den Ras-Proteinen, noch eine sogenannte Rho-Insertionsdomäne. Dies ist eine kurze helicale Aminosäuresequenz, welche eine Funktion in der Interaktion mit RhoGDIs ausübt und eine zusätzliche Interaktionsfläche für Effektorproteine darstellt (Valencia et al., 1991; Wu et al., 1997).

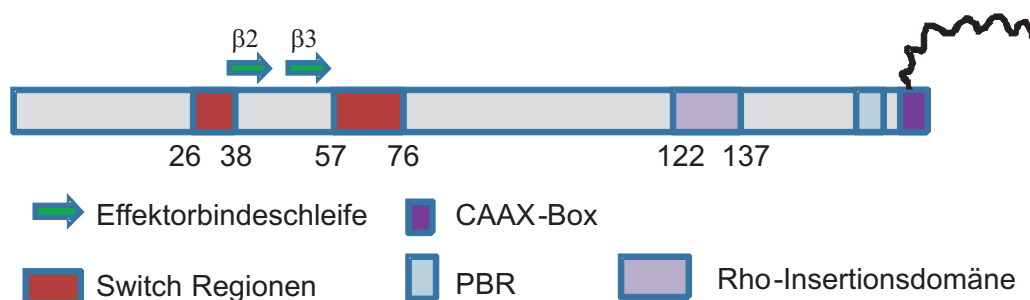


Abbildung 1.3: **Schematischer Aufbau der Proteine der Rho-Familie.**

Dargestellt sind die beiden Switch-Regionen, die Effektorbindeschleife, die Rho-Insertionsdomäne, die polybasische Region (PBR) sowie das CAAX-Lipidmodifikations-Motiv der Proteine.

### 1.2.1 Die kleine GTPase Cdc42

Die kleine GTPase Cdc42 wurde ursprünglich in *Saccharomyces cerevisiae* als temperatursensitive Zellzyklusmutante identifiziert (Johnson and Pringle, 1990; Adams et al., 1990). Cdc42 ist ein hoch konserviertes Protein und kommt in fast allen eukaryotischen Organismen vor. Sowohl in *S. cerevisiae* als auch in *Schizosaccharomyces pombe* ist Cdc42 ein essentielles Gen. Bei restriktiver Temperatur ist die Knospenbildung aufgrund von Defekten bei der Organisation des Aktin-Zytoskeletts gestört (Adams et al., 1990). Auch in höheren Organismen wurden Homologe zu Cdc42 beschrieben. Diese homologen Proteine sind dazu in der Lage, die temperatursensitive Mutante in *S. cerevisiae* zu komplementieren (Shinjo et al., 1990). Dies verdeutlicht, wie hoch Cdc42 auch in verwandtschaftlich weit entfernten Organismen konserviert ist. Auch in höheren Organismen ist Cdc42 an der Organisation des Aktin-Zytoskeletts beteiligt (Ridley and Hall, 1992; Ridley et al., 1992). Die Injektion von konstitutiv aktivem Cdc42 führt in Säugetierzellen zur Ausbildung von sogenannten Filopodien (Nobes and Hall, 1995; Kozma et al., 1995). Hierbei handelt es sich um Zylinder-artige Zellausläufer, die lineare, unverzweigte Aktinbündel enthalten (Small et al., 2002). Neben der Organisation des Aktin-Zytoskeletts ist Cdc42 an einer Vielzahl weiterer zellulärer Prozesse beteiligt, unter anderem an der Endozytose, der Regulation des Transkriptoms, der Zellpolarisierung, der Signaltransduktion und dem Vesikeltransfer (Kozminski et al., 2000; Etienne-Manneville, 2004; Cerione, 2004).

Die am besten untersuchte Funktion von Cdc42 ist die Regulation der Organisation des Aktinzytoskeletts. So wird die Aktinorganisation in höheren Organismen durch die Interaktion von aktivem Cdc42 mit dem Wiskott-Aldrich-Syndrom-Protein (WASP) beziehungsweise dem nah verwandten neuronalen N-WASP vermittelt (Symons et al., 1996; Rohatgi et al., 1999). Diese Proteine enthalten eine sogenannte "Cdc42/Rac interactive binding" (CRIB)-Domäne, welche spezifisch mit Cdc42 interagieren kann (Aspenstrom et al., 1996; Kolluri et al., 1996). Im ungebundenen Zustand wirkt diese CRIB-Domäne autoinhibitorisch auf das N-WASP Protein (Abdul-Manan et al., 1999; Kim et al., 2000). Die Bindung von aktivem Cdc42-GTP verursacht eine Konformationsänderung des N-WASP Proteins und führt zur Aufhebung der Autoinhibitions-Struktur, wodurch N-WASP mit dem aktinorganisierenden Arp2/3 Komplex interagiert und diesen aktivieren kann (Abdul-Manan et al., 1999; Kim et al., 2000; Stradal et al., 2004). Bei diesem Komplex handelt es sich um einen stabilen Proteinkomplex, welcher die Polymerisation von monomeren Aktinmolekülen zu verzweigten Aktinfilamenten induziert. Im Grundzustand ist der Arp2/3 Komplex inaktiv (Welch et al., 1998), kann aber durch die Bindung des N-WASP Proteins aktiviert werden (Kim et al., 2000). Auch in *S. cerevisiae* wurde ein zu N-WASP homologes Protein, Bee1, gefunden (Li, 1997). Der genaue Mechanismus der Regulation ist hier allerdings noch relativ unbekannt, da Bee1 die für die Interaktion mit Cdc42 notwendige CRIB-Domäne fehlt.

Cdc42 spielt eine weitere wichtige Rolle in der Ausbildung der Zellpolarität durch die Reorganisation des Aktinzytoskeletts. In *S. cerevisiae* ist Cdc42 am Knospungsprozess und an der Ausbildung von Paarungsstrukturen, den sogenannten "shmoos", beteiligt. In wachsenden Hefezellen erfordert die Bildung einer neuen Knospe eine Polarisierung der Zelle. In haploiden Zellen entsteht eine neue Knospe neben bereits vorhandenen Teilungsnarben. Dies wird als axiales

Knospungsmuster bezeichnet (Pruyne and Bretscher, 2000a,b). Die kleine GTPase Cdc42p ist bereits in sehr frühen Stadien dieses Prozesses involviert, denn temperatursensitive Mutanten sind schon in initialen Schritten der Polarisierung inhibiert (Pruyne and Bretscher, 2000b). Ein erster wichtiger Schritt ist die Ansammlung von aktivem Cdc42p an der zukünftigen Wachstumsstelle (Pruyne and Bretscher, 2000b). Der Mechanismus zur Rekrutierung von aktivem Cdc42 an diese Stelle ist nur teilweise verstanden. Vermutlich sind an der Teilungsnarbe noch Komponenten des Polaritätskomplexes vorhanden (Pruyne and Bretscher, 2000b). Diese Komponenten scheinen die frühere Teilungsstelle zu markieren und rekrutieren wiederum andere für das polare Wachstum notwendige Komponenten, wie die kleine GTPase Rsr1p, die die neue Knospungsstelle markiert (Park et al., 1997, 1999). Rsr1p rekrutiert den Cdc42p-spezifischen RhoGEF Cdc24p, was zu einer lokalen Aktivierung von Cdc42p führt (Shimada et al., 2004). Die Aktivierung von Cdc42p führt über die Reorganisation des Aktinzytoskeletts zur Polarisierung der Knospungsstelle. Sowohl *cdc42p*- als auch *cdc24*-Nullmutanten können keine Polaritätsachse während des Knospungsprozesses ausbilden (Adams et al., 1990). Die Polarisierung der Knospungsstelle erfordert die selektive Rekrutierung von Cdc42p, sowie seines Aktivators Cdc24p und seines Effektors (Ziman et al., 1993; Pruynne and Bretscher, 2000a). Die Initiation der Cdc42p-abhängigen Polarisationsprozesse ist abhängig von dem Gerüstprotein Bem1p. Bem1p interagiert sowohl mit Cdc42p und dem RhoGEF Cdc24p, als auch mit Proteinen an der zukünftigen Shmoos- und Knospungsstelle, wie Cdc42p-spezifischen Effektorproteinen, um diese an der Knospungsstelle zu konzentrieren (Bose et al., 2001; Butty et al., 2002).

### 1.2.2 Die kleine GTPase Rac1

Die kleine GTPase Rac1 ist sehr eng mit Cdc42 verwandt. Rac1 wurde ursprünglich als zelluläres Substrat für die ADP-Ribosylierung durch das C3-Toxin von *Clostridium botulinum* identifiziert (Didsbury et al., 1989). Aufgrund seiner Verwandtschaft zu Ras-Proteinen wurde es Rac genannt (ras-related C3 botulinum toxin substrate). Jedoch wurde später gezeigt, dass die Substrate dieser Toxine vielmehr Rho-Proteine sind (Menard et al., 1992). Rac1 ist ein hoch konserviertes Protein und ist in höheren Eukaryoten weit verbreitet. Interessanterweise gibt es keine Rac-Homologe in *S. cerevisiae* und *S. pombe*.

Wie auch Cdc42 ist Rac1 an der Regulation der Organisation des Aktinzytoskeletts beteiligt, indem es die Aktinpolymerisierung durch Stimulation des Arp2/3 Komplexes aktiviert. Im Unterschied zu Cdc42 sind die entscheidenden Bindeglieder zwischen Rac1 und dem Arp2/3 Komplex Effektorproteine der WAVE/Scar (WASP-family-verprolin-homologous/suppressor of cyclic AMP receptor)-Familie, welche WAVE sehr ähneln (Miki et al., 1998). Allerdings besitzen die drei bisher isolierten Isoformen keine CRIB-Domäne (Suetsugu et al., 1999). Die Interaktion zwischen der GTPase Rac1 und WAVE, findet über ein Adapterprotein IRSp53 (I receptor tyrosine kinase substrate p53) statt. WAVE bindet im aktiven Zustand an den Arp2/3-Komplex, welcher, wie bereits erwähnt, die Aktinpolymerisation induziert (Miki et al., 2000).

In Säugerzellen reguliert Rac1 die Ausbildung von Lamellipodien und sogenannten *membrane ruffles* (Ridley et al., 1992). Bei Lamellipodien handelt es sich um vorstehende flache Strukturen, die ein dicht verzweigtes Aktinzytoskelett aufweisen, welches zur Stabilisierung dient. Sie



befinden sich an den peripheren Bereichen von motilen Zellen (Small et al., 2002). Diese Strukturen dienen der Zelle zur Fortbewegung und zur Verankerung. *Membrane ruffles* hingegen sind Bereiche, in denen sich die Lamellipodien zurück falten und wellenförmige Strukturen bilden (Small et al., 2002). Bereiche in denen vermehrt *membrane ruffles* auftreten, zeigen eine erhöhte Aktivität an Makropinozytose und Phagozytose (Swanson and Watts, 1995).

Weitere Effektoren von Rac1 sind PAKs (p21-aktivierte Kinasen), mit welchen Rac1 über deren CRIB-Domäne interagiert (Brown et al., 1996). Rac1 übernimmt ebenfalls eine Funktion in der Regulation des Vesikeltransports bei der Endozytose und Pinozytose (West et al., 2000). In der Endozytose vermittelt Rac1 die Bildung von sogenannten "*clathrin coated pits*", in dem es mit dem Protein Arf6 einen Komplex bildet, welcher an der Regulation der rezeptorvermittelten Endozytose beteiligt ist (Altschuler et al., 1999).

### 1.3 Regulation von kleinen GTPasen durch Guanin-Nukleotid-Austausch-Faktoren

Kleine GTPasen fungieren als molekulare Schalter in einer Vielzahl von zellulären Prozessen. Aus diesem Grund ist es extrem wichtig, dass ihre Aktivität sorgfältig kontrolliert wird. Um aktiv zu sein, müssen kleine GTPasen von der GDP-gebundenen Form in die GTP-gebundene Form wechseln. Dieser Nukleotid-Austausch wird von "Guanin-Nukleotid-Austausch-Faktoren" (GEFs) katalysiert. Der erste bekannte GEF für RhoGTPasen aus Säugerzellen wurde 1985 als Onkogen aus einem Diffusen B-Zell Lymphom isoliert und daraufhin Dbl genannt (Eva and Aaronson, 1985). Dbl katalysiert *in vitro* den Nukleotid-Austausch an humanem Cdc42 (Hart et al., 1991). Es wurde gezeigt, dass eine etwa 180 Aminosäuren große Region für die katalytischen Fähigkeiten des Proteins essentiell ist (Hart et al., 1994). Dieser Proteinabschnitt wird als Dbl Homologie (DH)-Domäne bezeichnet und ist in allen Mitgliedern der sogenannten "Dbl-Familie" der Rho-GEFs konserviert. Fast alle bekannten RhoGEFs der RhoGTPasen gehören zur Dbl-Familie. Proteine dieser Familie finden sich in allen Eukaryoten mit Ausnahme der Pflanzen (Schultz et al., 1998). Der Nukleotid-Austausch-Mechanismus ist zwischen den verschiedenen RhoGEFs sehr konserviert. RhoGEFs katalysieren den Nukleotid-Austausch von GDP zu GTP, indem sie die Freisetzung von GDP und Magnesium katalysieren und die GTPase in einem Nukleotid-freien Zustand stabileren (Bourne et al., 1990). Da GTP in der Zelle in deutlich höherer Konzentration als GDP vorliegt, wird bevorzugt dieses Nukleotid gebunden und die aktive GTPase freigegeben (Rossman et al., 2005). Die DH-Domänen bildet dabei das minimale Element für die katalytische Aktivität der RhoGEFs und bestehen aus überwiegend helicalen Strukturen.

Für die katalytischen Fähigkeiten sind drei hoch konservierte helicale Bereiche (CR1-CR3) innerhalb der DH-Domäne essentiell. Diese interagieren miteinander und bilden so den Kern der Domäne (Liu et al., 1998). Punktmutationen innerhalb dieser drei konservierten Regionen führen zum Verlust der GEF-Aktivität (Hoffman and Cerione, 2002). Die CR1 und CR3 Region der DH-Domäne bilden eine Art Interaktionsfläche oder "Bindetasche" aus, die Interaktionen mit der GTPase eingeht. Die Interaktionen erfolgen über die Switch-Regionen der GTPasen, wobei die SwitchI-Region mit CR1 und CR3 und SwitchII-Region hingegen nur mit CR3 interagiert. Es

sind jedoch auch noch zusätzliche Interaktionen zwischen den nicht konservierten Bereichen der Domäne und Bereichen außerhalb der Switch-Regionen der GTPasen möglich. Diese Interaktionen sind allerdings zwischen DH-Domänen verschiedener RhoGEFs und GTPasen sehr variabel und daher wird angenommen, dass diese Interaktionen für die GTPase-Spezifität innerhalb der Rho-Familie verantwortlich ist (Rossman et al., 2005).

Biochemisch verläuft der Nukleotid-Austausch über einen mehrstufigen Prozess ab. Zunächst interagiert der RhoGEF mit der Effektorbindeschleife ( $\beta 2$ - $\beta 3$ ) und Teilen der SwitchII-Region der GTPase nach einer Art "Schlüssel-Schloss" Prinzip. Diese Interaktion führt zu einer Umstrukturierung der SwitchI-Region und zu einer Verformung der Nukleotidbindetasche. Durch die Strukturänderung der SwitchI-Region kommt es zu einer Blockierung der Magnesium-Bindetasche, wodurch das gebundene Magnesium-Ion und das GDP verdrängt werden. Zusätzlich ermöglicht die Verschiebung der Switch-Regionen zwei elektrostatische Wechselwirkungen, welche die nukleotidfreie Konformation der Phosphatbindeschleife stabilisieren (Rossman et al., 2005). Diese Strukturänderung ist reversibel und wird bei einer Bindung von GTP im Komplex mit Magnesium umgekehrt (Rossman et al., 2005).

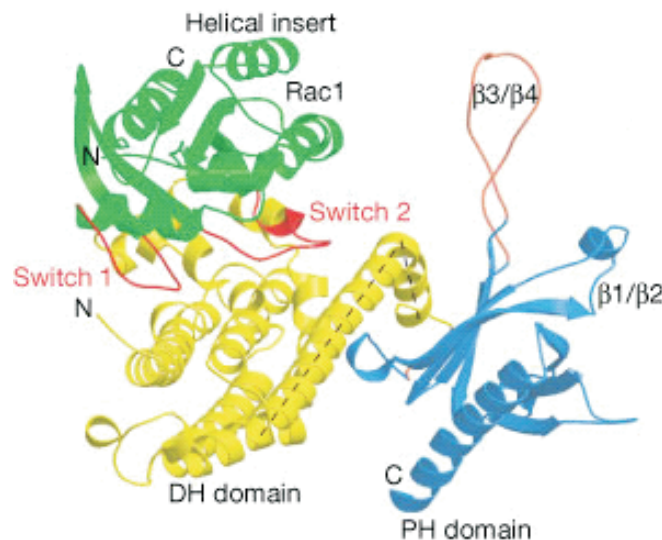


Abbildung 1.4: **Kristallstruktur des RhoGEFs Tiam1 in Komplex mit Rac1 (Worthylake et al., 2000).**

Die katalytische DH-Domäne (in gelb dargestellt) des RhoGEFs TIAM tritt über die konservierten Regionen CR1 und CR3 in Kontakt mit der GTPase Rac1 (in grün dargestellt).

In nahezu allen Mitgliedern der Dbl-Familie ist in unmittelbarer Nachbarschaft der DH-Domäne eine C-terminal gelegene Pleckstrin Homologie (PH)-Domäne zu finden. Dieses DH-PH-Motiv stellt ein charakteristische Tandem-Motiv dar. Dabei übt die PH-Domäne Funktionen bei der Lokalisation und bei der Regulation des RhoGEFs aus. Viele PH-Domänen werden als Protein-Lipid-Interaktionsdomänen beschrieben (Lemmon et al., 2002). Über Interaktionen mit Phosphatidyl-Inositol-Phosphaten können PH-Domänen den RhoGEF an der Membran veran-

kern (Ferguson et al., 1995). Eine Membranlokalisation ist notwendig, da kleine GTPasen über ihre posttranslationale Lipidmodifikation ebenfalls an der Membran lokalisiert sind. Da die Spezifität und Affinität dieser Interaktion jedoch gering ist, sind anscheinend weitere Mechanismen zur Lokalisation eines RhoGEFs nötig (Snyder et al., 2001).

Neben der Rolle bei der Lokalisation an Membranen wird für die PH-Domäne ebenfalls eine mögliche Funktion bei der Regulation des Nukleotid-Austauschs diskutiert (Snyder et al., 2001; Erickson and Cerione, 2004). Untersuchungen haben gezeigt, dass einige DH-Domänen zusammen mit der PH-Domäne eine höhere Nukleotid-Austausch-Aktivität aufweisen (Liu et al., 1998; Rossman and Campbell, 2000). Möglicherweise führt eine Interaktion zwischen der PH-Domäne mit Phosphatidyl-Inositol-Phosphaten in der Membran zu einer Veränderung der Orientierung der DH- und PH-Domänen zueinander. Dies könnte die DH-Domäne in eine für den Nukleotid-Austausch günstigere sterische Konformation bringen und damit eine Erhöhung der katalytischen Aktivität zur Folge haben. Ein Beispiel dafür ist der Cdc42-spezifische RhoGEF Dbs (Rossman et al., 2002b, 2003). Anhand von Kristallstrukturen konnte gezeigt werden, dass die PH-Domäne direkt mit Cdc42 interagiert. Durch diese Interaktion wird Cdc42 in eine für den Nukleotid-Austausch günstigere Position verschoben. Dies konnte damit untermauert werden, dass die isolierte DH-Domäne von Dbs eine deutlich geringere Nukleotid-Austausch-Aktivität aufweist, als das DH-PH Tandem-Motiv (Rossman et al., 2002b, 2003). Zusätzlich könnte die Bindung von Phosphoinositiden durch die PH-Domäne die Aktivität des RhoGEFs allosterisch beeinflussen (Das et al., 2000).

Bei RhoGEFs handelt es sich meist um multifunktionale Proteine, die neben dem klassischen DH-PH-Motiv oft weitere Protein-Motive enthalten. Es wird angenommen, dass diese zusätzlichen Domänen dem RhoGEF ermöglichen, auf vorgeschaltete Signale durch Protein-Protein-Interaktionen zu reagieren. So finden sich häufig in RhoGEFs zusätzliche Protein-Protein-Interaktionsdomänen, wie beispielsweise SH3-, *Coiled coil*- oder PDZ-Domänen. Diese erlauben eine Interaktion mit anderen Proteinen und somit eine Integration des RhoGEFs in größere Signal-Netzwerke (Garcia-Mata and Burrige, 2007). Gleichzeitig kann ein RhoGEF über diese zusätzlichen Domänen auch als Gerüstprotein dienen und so den Aufbau eines Signalkomplexes erlauben (Cestra et al., 2005). Darüber hinaus können RhoGEFs neben der PH-Domäne noch weitere Lipid-Protein-Interaktionsdomänen enthalten. Zu diesen Domänen zählen beispielsweise die FYVE-Domänen, die ENTH-Domänen oder Sec14-Domänen. Diese zusätzlichen Lipid-Interaktionen ermöglichen die Rekrutierung eines RhoGEFs an spezifische subzelluläre Kompartimente (Rossman et al., 2005; Huber et al., 2008; Schink and Bölker, 2009).

Neben der klassischen Dbl-Familie der RhoGEFs wurde eine weitere Familie identifiziert, die den Nukleotid-Austausch an kleinen GTPasen der Rho-Familie katalysieren. Es handelt sich um die Familie der DOCK180-Proteine (Takai et al., 1996; Hasegawa et al., 1996). Im Gegensatz zu den etwa 70 bekannten humanen RhoGEFs der Dbl-Familie, enthält die Familie der DOCK180 bisher 11 Mitglieder (Brugnera et al., 2002). Alle Mitglieder besitzen zwei DOCK Homology Regions, DHR1 und DHR2, die allerdings keine Sequenzähnlichkeiten zur DH- oder PH-Domäne der Mitglieder der Dbl-Familie aufweisen. Die DHR2-Domäne ist notwendig und ausreichend, um den Nukleotid-Austausch an kleinen GTPasen der Rho-Familie zu katalysieren (Côté and Vuori,

2002). Obwohl diese Proteine strukturell sehr unterschiedlich zu den RhoGEFs der Dbl-Familie sind, benutzen sie dennoch einen nahezu identischen Nukleotid-Austausch-Mechanismus.

### 1.3.1 Regulation von RhoGEFs

Da RhoGEFs in eine Vielzahl intrazellulärer Netzwerke involviert sind, ist es unbedingt notwendig, dass diese regulatorischen Proteine streng kontrolliert werden. Die Notwendigkeit, die Aktivität der RhoGEFs sicherzustellen, wird dadurch verdeutlicht, dass viele konstitutiv aktive RhoGEFs als Onkogene wirken (Hart et al., 1994; Ron et al., 1989, 1991). Es wurden bisher einige generelle Mechanismen zur Regulation von RhoGEFs identifiziert. Dies kann z.B. über intramolekulare autoinhibitorische Strukturen, Phosphorylierung oder durch direkte Protein-Protein-Interaktion geschehen (Schmidt and Hall, 2002).

In der Regel befinden sich RhoGEFs in der inaktiven Form, die oft durch die Ausbildung von intramolekularen autoinhibitorischen Strukturen vermittelt wird (Bi et al., 2001). Eine solche autoinhibitorische Struktur kann beispielsweise durch eine Interaktion des N- oder C-Terminus mit der katalytischen DH-Domäne ausgebildet werden, wodurch die Bindestelle der GTPase maskiert und eine Aktivierung verhindert wird. Diese maskierenden Strukturen können auf verschiedene Weise aufgehoben werden, wie durch die Interaktion mit anderen Proteinen, die proteolytische Spaltung der regulatorischen Region oder auch durch Phosphorylierung.

Weiterhin spielt auch die Interaktion mit anderen Proteinen eine wichtige Rolle bei der Regulation von RhoGEFs. Ein Beispiel ist der RhoGEF Cdc24 in *S. cerevisiae*. Die Aktivität von Cdc24 wird über eine Homodimerisierung der DH-Domäne reguliert. Hierbei wird Cdc24 durch Dimerisierung im inaktiven Zustand gehalten (Mionnet et al., 2008). Es ist auch bekannt, dass RhoGEFs durch die Interaktion mit anderen Faktoren im Zellkern in ihrer inaktiven Form festgehalten werden können. So interagiert beispielsweise Cdc24 in *S. cerevisiae* mit Far1p, dass Cdc24 in den Zellkern rekrutiert und wo es in der inaktiven Form gehalten wird (Nern and Arkowitz, 2000; Shimada et al., 2000). Erst nach dem Transport aus dem Zellkern kommt es zur Aktivierung von Cdc24 und der RhoGEF kann mit seinem Substrat Cdc42 interagieren und die kleine GTPase aktivieren (Shimada et al., 2000).

Bisher ist wenig darüber bekannt, wie RhoGEFs wieder inaktiviert werden. Ein sehr einfacher Mechanismus sind reversible Modifikationen. So kann ein RhoGEFs nach Aktivierung durch Phosphorylierung über eine Dephosphorylierung wieder inaktiviert werden. Auch die Aktivierung durch Protein-Protein-Interaktionen kann durch eine Zerstörung dieser Interaktion aufgehoben werden. Schwieriger stellt sich die Situation dar, wenn die Aktivierung durch proteolytische Spaltung erfolgt. Ein möglicher Inaktivierungsmechanismus ist hierbei die proteosomale Degradierung des aktiven Proteins. Für den RhoGEF FGD1 konnte gezeigt werden, dass dieser durch eine spezifische Ubiquitin-Ligase phosphorylierungsabhängig ubiquitiniert und anschließend abgebaut wird (Hayakawa et al., 2005).

### 1.3.2 Protein-Lipid-Interaktionen und Erkennung von Membrankrümmungen

Die unterschiedlichen Kompartimente einer eukaryotischen Zelle weisen eine unterschiedliche, für ein jeweiliges Kompartiment charakteristische, Membranzusammensetzung auf. Diese unter-

schiedliche Zusammensetzung zeichnet sich insbesondere durch ihren verschiedenen Gehalt an Phosphatidyl-Inositol-Phosphate aus (Simonsen et al., 2001). Beispielsweise besitzen Endosomen eine hohe Konzentration an PtdIns(3)P (Li et al., 1995), während PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> charakteristisch für die Plasmamembran ist. Je nach Lipidzusammensetzung einer Membran werden unterschiedliche Effektorproteine an diese rekrutiert. Einige dieser Proteine rekrutieren wiederum Phosphokinasen oder sind selber Phosphokinasen, welche die Phospholipide eines Kompartiment modulieren können. Dadurch kann der Charakter des jeweiligen Kompartiments verändert werden, wodurch andere Effektoren rekrutiert werden können (Botelho, 2009). So besteht ein enger Zusammenhang zwischen der Phospholipidzusammensetzung eines Kompartiments und den von ihnen rekrutierten Effektoren, wodurch das Kompartiment eine spezifische Identität erhält. Neben der Vielzahl an unterschiedlichen Phosphoinositol-Lipiden gibt es eine ebenso große Anzahl an lipidbindenden Domänen, wie z.B. PH-, PX- oder FYVE-Domänen. Diese lipidbindenden Domänen dienen oft der Rekrutierung ihrer Proteine an bestimmte Kompartimente innerhalb der Zelle.

Wie bereits erwähnt, ist die PH-Domäne ein Teil des charakteristischen DH-PH Tandem-Motivs der RhoGEFs. Diese Domäne übernimmt vermutlich neben der Funktion in der Regulation der Aktivität und Funktion von RhoGEFs ebenfalls eine Aufgabe in der Lokalisation der Proteine an Membranen. Diese Lokalisation ist notwendig, da ihre Substrate, die kleinen GTPasen, durch ihre C-terminale Lipidmodifikation und ihre polybasische Region auch an Membranen lokalisieren (vergleiche Abschnitt 1.2); (Ziman et al., 1993; Adamson et al., 1992b). So besitzen RhoGEFs häufig noch zusätzliche lipidbindende Domäne, die diese Proteine gezielt an definierte zelluläre Kompartimente lokalisieren. Dort können sie die Aktivität der kleinen GTPasen modulieren.

Neben diesen lipidbindenden Domänen, die spezifische Phosphoinositol-Spezies erkennen, gibt es eine weitere Klasse von Domänen, die eine Assoziation mit Membranen ermöglicht, die sogenannten Bin-Amphiphysine-Rvs (BAR)-Domänen. Diese Domänen erkennen allerdings nicht eine bestimmte Lipidzusammensetzung eines Kompartiments. Vielmehr erkennen BAR-Domänen eine mechanische Eigenschaft von Membranen, nämlich bestimmte Membrankrümmungen. BAR-Domänen kommen in einer Vielzahl eukaryotischer Proteine vor und werden mit einer außergewöhnlichen Diversität von zellulären Prozessen in Verbindung gebracht. BAR-Domänen Proteine sind unter anderem an der Endozytose, am intrazellulären Transport, der Zellpolarität, der Regulation des Aktin-Zytoskeletts, Signaltransduktion und sekretorischer Vesikelfusion beteiligt (Ren et al., 2006). Strukturell gesehen handelt es sich bei BAR-Domänen um längliche "bananen-förmige" Dimere, wobei jedes Monomer eine "*Coiled-coil*" Struktur aus drei  $\alpha$ -Helices bildet (siehe Abb. 1.5) (Hinshaw and Schmid, 1995; Peter et al., 2004).

Die Krümmung des Dimers wird unter anderem darüber bestimmt, wie die beiden Monomere sich kreuzen. Auch die Schleife zwischen der zweiten und dritten Helix ist an der Ausbildung dieser Oberfläche beteiligt. Die konkav geformte Oberfläche, ebenso wie die Schleifen zwischen den beiden Helices, ist reich an den positiv geladenen Aminosäuren Lysin und Arginin (Hinshaw and Schmid, 1995). Durch diese positiv geladene Oberfläche binden BAR-Domänen vorzugsweise an stark gekrümmten negativ geladenen Phospholipid-Membranen über elektrostatische Wechselwirkungen (siehe Abb. 1.5). BAR-Domänen weisen allerdings keine starke Lipidspezifität auf (Peter et al., 2004). *In vitro* können BAR-Domänen an Liposomen mit einem definierten

Durchmesser binden, welcher durch die Krümmung der Oberfläche der Domäne bestimmt wird (Peter et al., 2004). Aus der Struktur von BAR-Domänen geht hervor, dass sie dimerisieren müssen, um funktional zu sein (McMahon and Gallop, 2005; Peter et al., 2004). Es wird allerdings davon ausgegangen, dass BAR-Domänen zunächst als Monomere vorliegen und dass es erst zur Dimerisierung kommt, wenn sie an Membranen binden. BAR-Domänen können untereinander sowohl Homo- als auch Heterodimere ausbilden.

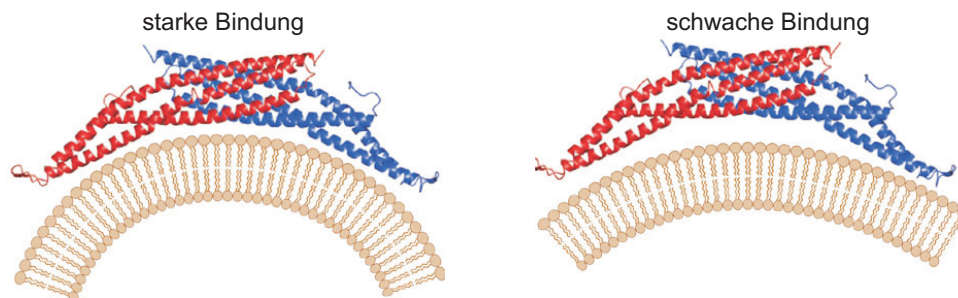


Abbildung 1.5: Die Interaktion der BAR-Domäne mit schwach und stark gekrümmten Membranen (McMahon and Gallop, 2005).

BAR-Domänen binden über Dimerisierung eine konkav geformte Oberfläche aus. Die Monomere sind in rot und blau dargestellt. Die Bindung der BAR-Domäne erfolgt besser an stärker gekrümmten Membranen aufgrund der größeren Möglichkeiten elektrostatische Interaktionen über die gesamte membranbindende Oberfläche der BAR-Domäne hervorzubringen.

Interessanterweise können BAR-Domänen nicht nur spezifische Krümmungen detektieren. Sie können unter bestimmten Umständen auch Membrankrümmungen *de novo* induzieren (Peter et al., 2004; Zimmerberg and McLaughlin, 2004; Blood and Voth, 2006).

Häufig besitzen BAR-Domänen eine N-terminale amphipathische Helix und gehören damit zur Subgruppe der N-BAR-Domänen. Alle diese N-BAR-Domänen können *in vitro* die Tubulierung von Membranen induzieren (Takei et al., 1999; McMahon and Gallop, 2005). Amphipathische Helices bestehen aus einer  $\alpha$ -Helix, von der eine Seite polar oder positiv geladen ist und die andere Seite hydrophob ist (siehe Abb. 1.6). Die Helix liegt zunächst flach auf der Membran und die hydrophoben Anteile inserieren in die hydrophobe Phase des Lipid-*Bilayers* der Membran. Dies führt zu einer Verdrängung der Phospholipide innerhalb der Membran. Diese Verdrängung der Phospholipide auf nur einer Seite des Lipid-*Bilayers* verursacht eine positive Krümmung der Membran. So können N-BAR-Domänen lokale Membrankrümmungen induzieren, indem sie über ihre N-terminale Helix in die Membran inserieren. Die Membrankrümmung wird über ihre konkav-geformte Oberfläche stabilisiert, indem diese als eine Art Gerüst dient (McMahon and Gallop, 2005; Blood and Voth, 2006).

Die N-terminale Helix ist wichtig, aber nicht unbedingt notwendig um Membrankrümmungen zu induzieren (Peter et al., 2004). So konnte gezeigt werden, dass eine sehr hohe Konzentration an klassischen BAR-Domänen ebenfalls zur Induktion von Membrankrümmungen führen kann. Hierbei kommt es zur Ausbildung einer "Exoskelett"-ähnlichen Struktur, welche die Membran umgibt. Diese Struktur zwingt die Membran in die vorgegebene Krümmung hinein (McMahon and Gallop, 2005). Dies erfolgt aber nur bei sehr hohen Proteinkonzentrationen, während N-

## 1 Einleitung

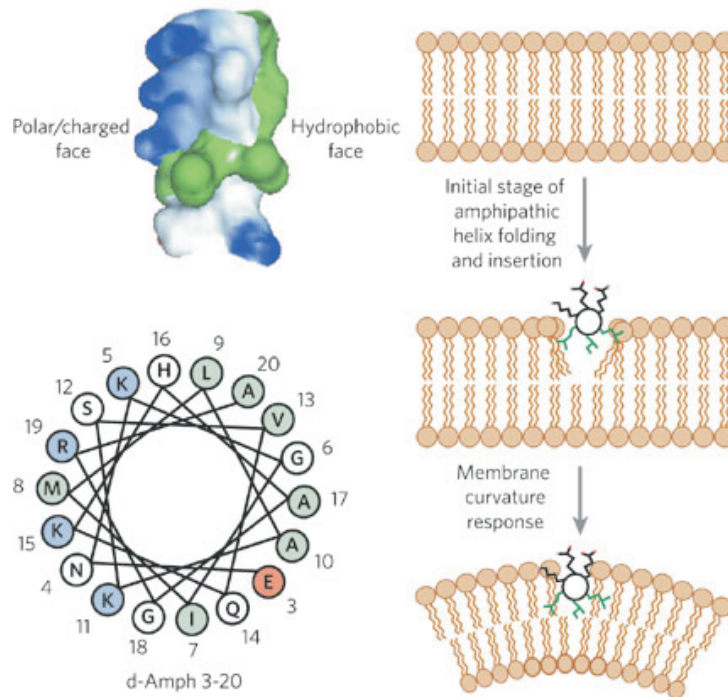


Abbildung 1.6: **Struktur der amphipathischen Helix von Amphiphysin aus *Drosophila melanogaster* (McMahon and Gallop, 2005).**

Die amphipathische Helix kann als axiale Projektion dargestellt werden. Die hydrophoben Aminosäuren sind grün markiert, die polaren, ungeladenen sind weiß markiert, die positiv geladenen sind blau, sowie die negativ geladenen sind rot markiert. Die Helix formt sich nach Kontakt mit der Membran, wobei der hydrophobe Anteil in die Membran inseriert und aktiv zu einer Verstärkung der Membrankrümmung führt.

BAR-Domänen diese hohen Konzentrationen nicht benötigen.

Die Frage, ob eine BAR-Domäne eine Membran bindet oder eine bestimmte Membrankrümmung induziert, hängt davon ab, ob die Differenz der Bindungsenergie zwischen einer gekrümmten und einer flachen Membran größer ist, als die Energie die benötigt wird, um eine Membrankrümmung zu induzieren (Peter et al., 2004). Wenn die Differenz der Bindungsenergie nicht ausreichend ist für eine Deformation der Membran, kann die BAR-Domäne nicht in diesem Membranbereich binden, sondern lediglich an Strukturen mit einer bereits bestehenden, passenden Membrankrümmung. Die Fähigkeit von BAR-Domänen Membrankrümmungen zu erkennen, zu binden und zu induzieren, deutet auf einen neuen Mechanismus für eine räumliche und zeitliche Kompartimentalisierung von Proteinen an ganz bestimmte Membrandomänen hin.

Weiterhin zeigen BAR-Domänen eine Ähnlichkeit zur GTPase-Bindedomäne von Arfaptin2, einem Effektor von Rho- und Arf-GTPasen (siehe Abb. 1.7). Auch für andere BAR-Domänen Proteine, wie z.B. APPL1 und APPL2, wurde berichtet, dass sie an kleine GTPasen binden. Es wird daher vermutet, dass einige BAR-Domänen auch kleine GTPasen erkennen können (Tarricone et al., 2001; Habermann, 2004). Die Bindung von BAR-Domänen an eine Membran wird so mit der Regulation der Signaltransduktion verknüpft. Allerdings ist die Bindung der BAR-Domäne an GTPasen und an Membrankompartimente nicht gleichzeitig möglich, da beide Interaktionen von derselben konkaven Region der Domäne ausgeführt werden (Tarricone et al.,



2001; Habermann, 2004). Dieses Ausschlussprinzip könnte auf einen Mechanismus hindeuten, der eine gegenseitige Regulation von kleinen GTPasen und der Erkennung und Induktion von spezifischen Membrankrümmungen ermöglicht.

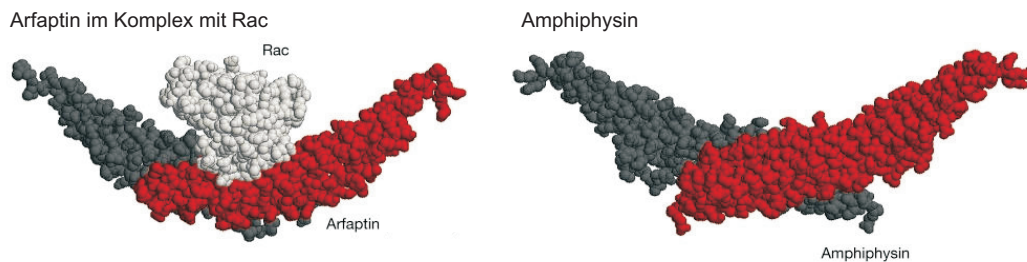


Abbildung 1.7: **Kristallstruktur der BAR-Domänen von Rac-gebundenem Arfaptin2 und Amphiphysin (Habermann, 2004).**

Die BAR-Domänen beider Proteine bilden ein bananen-förmiges Dimer aus. Die kleine GTPase Rac (hellgrau) bindet an das aktive Zentrum des Arfaptin 2-Dimers. Ein Monomer jedes Heterodimers ist jeweils rot bzw. dunkelgrau dargestellt.

## BAR-Domänen gekoppelte RhoGEFs

Im humanen System wurde mit dem Protein TUBA ein RhoGEF der Dbl-Familie identifiziert, der anstelle der klassischen PH-Domäne eine BAR-Domäne besitzt. Dies hebt die Verknüpfung der Erkennung bestimmter Membrankrümmungen mit der Regulation von kleinen GTPasen hervor. Dies ist insofern Interessant, da kleine GTPasen eine wichtige Rolle in der Regulation der Aktinorganisation und Umstrukturierung des Zytoskeletts übernehmen. Hierbei handelt es sich um wichtige Prozesse, in denen es zur Änderung der Membranomorphologie kommt (Schmitz et al., 2000). TUBA fungiert im menschlichen System als Gerüstprotein, welches die GTPase Dynamamin und Aktin-regulierende Proteine verbindet. Über die Funktion von TUBA ist bisher noch nicht viel bekannt. TUBA ist ein großes Multidomänenprotein und lokalisiert an Synapsen im Gehirn. Aufgrund seiner Größe und Lokalisierung wurde es, gemäß der Tradition große synaptische Proteine nach Musikinstrumenten zu benennen, TUBA genannt.

Neben der charakteristischen katalytischen DH-Domäne, die in TUBA von einer BAR-Domäne begleitet wird, enthält dieses Protein noch vier N-terminale Src Homologie 3 (SH3)-Domänen und zwei C-terminale SH3-Domänen. Über die N-terminalen SH3-Domänen bindet TUBA spezifisch die GTPase Dynamamin. Es wurde gezeigt, dass Dynamamin eine wichtige Rolle in der Endozytose spielt (Slepnev and Camilli, 2000) und weiterhin auch Funktionen in der Regulation des Aktin-Zytoskeletts übernimmt (Schafer, 2002; Krueger et al., 2003; Ochoa et al., 2000). TUBA bindet zudem über die C-terminalen SH3-Domänen eine Vielfalt an Aktin-regulierenden Proteinen, wie z.B. N-WASP oder Ena/VASP. TUBA katalysiert spezifisch den Nukleotid-Austausch an der kleinen GTPase Cdc42, zeigt aber keinerlei Aktivität gegenüber Rac1 und RhoA (Salazar et al., 2003)(Salazar et al., 2003). TUBA kontrolliert die Organisation des Aktin-Zytoskeletts über zwei unabhängige Mechanismen. Zum einen über die Bindung und Aktivierung von Aktin-regulierenden Proteinen über die C-terminalen SH3-Domänen (Hussain et al., 2001; Rohatgi



et al., 1999), zum anderen durch die Aktivierung der kleinen GTPase Cdc42, die ebenfalls in die Regulation des Aktin-Zytoskeletts involviert ist (Rohatgi et al., 1999). TUBA stellt damit eine Verknüpfung zwischen der Endozytose, den Signalwegen der RhoGTPase Cdc42 und der Regulation des Aktin-Zytoskeletts her.

Der RhoGEF Gef1p aus *S. pombe* weist hohe Ähnlichkeit zu TUBA auf. Allerdings besitzt Gef1p zwar die für RhoGEFs charakteristische DH-Domäne, jedoch weder eine daran angrenzende PH-Domäne noch eine BAR-Domäne. Gef1p lokalisiert am Teilungsseptum und ist der Regulation der Zellpolarität und in die Zytokinese involviert (Coll et al., 2003).

Gef1p interagiert über seine C-terminale Region mit dem BAR-Domänen Protein Hob3p. Durch diese zusätzliche BAR-Domäne wird vermutlich die fehlende PH-Domäne von Gef1p ersetzt. Hob3p kann zudem unabhängig von Gef1p an Cdc42p binden und die GTPase an die Teilungsebene rekrutieren. Gef1p, Hob3p und Cdc42p bilden dort einen Komplex, wobei Hob3p sowohl die Interaktion zwischen Gef1p und Cdc42p erleichtert, als auch die Aktivierung der beiden Proteine stimuliert (Coll et al., 2007). Zellen, in denen Hob3p deletiert wurde, zeigen Defekte in der Initiation der Kontraktion des Aktomyosinrings, der zeitlichen Regulierung der Septenbildung und Zelltrennung. Da der Arp2/3 Komplex in den gleichen Prozessen eine Aufgabe übernimmt, ist Hob3p, vermutlich im Komplex mit Gef1p und Cdc42p über die Aktivierung der Arp2/3 Komplex-stimulierten Aktinpolymerisation in die Zytokinese involviert (Coll et al., 2007).

### 1.4 *Ustilago maydis* als Modellorganismus

*Ustilago maydis* ist ein phytopathogener Brandpilz und wird in das Phylum der *Basidiomyceten* eingeordnet. *U. maydis* hat ein sehr eingeschränktes Wirtsspektrum. Der Pilz infiziert nur Maispflanzen und Teosinte, wobei er alle oberirdischen Teile der Pflanze befallen kann. Im Falle einer Infektion kommt es zur Ausbildung von Gallen, in denen die Entwicklung und Produktion der diploiden Teliosporen des Pilzes stattfindet. *U. maydis* stellt heutzutage einen interessanten Modellorganismus dar, da er sich für die Untersuchung vieler grundlegender Probleme der Morphogenese und Zellpolarität gut eignet. Die Genomsequenz des Pilzes ist vollständig bekannt und öffentlich zugänglich, wodurch moderne Methoden der genomweiten Transkriptom- und Proteom-Analyse durchgeführt werden können. Zudem sind die Zellen im haploiden Stadium leicht zu kultivieren und für einfache gentechnische Methoden zugänglich (Steinberg and Perez-Martin, 2008).

#### 1.4.1 Der Lebenszyklus von *Ustilago maydis*

Der phytopathogene Pilz *U. maydis* zeigt einen dimorphen Lebenszyklus und wechselt zwischen einer nichtpathogenen haploiden und einer pathogenen diploiden Form. Die haploiden Zellen vermehren sich vegetativ durch bipolare Knospung. Treffen zwei kompatible Kreuzungspartner aufeinander, erkennen sich diese über ein Pheromon-Rezeptorsystem. Dadurch kommt es zum Zellzyklusarrest und zur Ausbildung von Konjugationsschläuchen, die sich entlang des Pheromongradienten orientieren und aufeinander zuwachsen (Snetselaar et al., 1996). Nach der Fusion an der Spitze entsteht eine obligat parasitäre dikaryotische Infektionshyph. Durch den Einzug

von Septen an der Filamentbasis wird der zytoplasmahaltige Teil gegen die entleerten Abschnitte abgegrenzt (Snetselaar et al., 1996). Das filamentöse Dikayon verlängert sich durch apikales Spitzenwachstum (Banuett and Herskowitz, 2002) und dringt mit Hilfe Appressorien-artiger Strukturen und durch natürliche Öffnungen, wie Stomata, in die Pflanze ein. Im meristematischen Gewebe kommt es zur Zellwucherung. Der Pilz induziert die Ausbildung von Gallen, in denen die Karyogamie und die Differenzierung zu stark pigmentierten diploiden Teliosporen erfolgt (Banuett and Herskowitz, 1994, 1996). Nach dem Aufbrechen des Tumors werden die Teliosporen durch Wind und Regen verbreitet. Die Teliospore stellt die Dauerform des Pilzes dar, die unter geeigneten Bedingungen auskeimt und nach Durchlauf der Meiose zur Bildung der haploiden, saprophytischen Form führt.

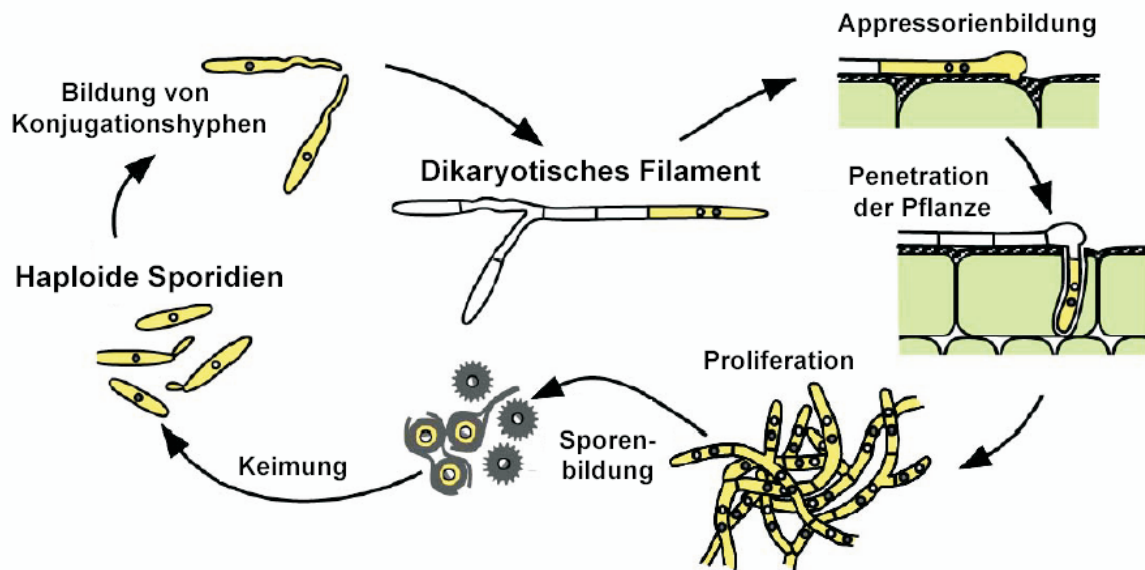


Abbildung 1.8: Der Lebenszyklus von *U. maydis*.

*U. maydis* ist ein dimorpher pflanzenpathogener Pilz. In seiner haploiden, saprophytischen Form vermehrt es sich durch Knospung. Kompatible, haploide Sporidien können sich anhand eines Pheromon-Pheromonrezeptorsystems erkennen, aufeinander zuwachsen und an der Spitze zu einem dikaryotischen Filament fusionieren. Diese Form von *U. maydis* ist pathogen und kann Maispflanzen penetrieren und die Ausbildung von Gallen induzieren. Innerhalb dieser Gallen erfolgt die Proliferation und die Bildung von diploiden Sporen. Die mit Sporen gefüllten Gallen platzen schließlich auf und die Sporen können über Wind und Regen verteilt werden. Unter geeigneten Bedingungen können diese wieder zu haploiden Sporidien auskeimen (nach (Kämper et al., 2006)).

Der Übergang zur sexuellen Phase wird von einem tetrapolaren Kreuzungssystem kontrolliert. Für eine Fusion und die anschließende pathogene Entwicklung müssen sich die Kreuzungspartner in den Kreuzungstyploci *a* und *b* unterscheiden (Banuett and Herskowitz, 1989). Der bialleliche *a*-Lokus kontrolliert die pheromonabhängige Zell-Zell-Erkennung und kodiert für die Vorstufe eines spezifischen Pheromons und eines Rezeptors. Der Rezeptor erkennt die Anwesenheit des Pheromons des anderen Paarungstyps (Bölker et al., 1992). Wenn sich zwei Zellen in diesem Lokus unterscheiden, können sie mit Hilfe des Pheromon-Rezeptorsystems Konjugationshyphen ausbilden. Damit sich ein stabiles dikaryotisches, pathogenes Filament bilden kann, müssen sich die Zellen auch im multiallelischen *b*-Lokus unterscheiden, der die Selbst/Nicht-Selbst-Erkennung

der beiden Kerne vermittelt. Dieser *b*-Lokus besteht aus zwei divergent transkribierten Genen, *bE* (east) und *bW* (west), die zur Familie der Homeodomänen-Proteine gehören (Schulz et al., 1990). Diese können ein Heterodimer bilden, allerdings nur dann, wenn sie von unterschiedlichen Allelen stammen. Das gebildete Heterodimer fungiert als Transkriptionsfaktor und reguliert die Expression von Genen, die für die pathogene Entwicklung benötigt werden (Kämper et al., 1995).

### 1.4.2 Die Rolle von kleinen GTPasen in *Ustilago maydis*

Für die pathogene Entwicklung von *U. maydis* ist es erforderlich, dass die Zelle ihre Morphologie wechselt und vom hefeähnlichen, knospenden Wachstum zum filamentösem Wachstum umschaltet. Dieser Übergang vom haploiden zum filamentösem Wachstum erfordert eine Umorganisation des Aktinzytoskeletts sowie die Etablierung einer Polaritätsachse. In diesen Prozessen spielen kleine GTPasen eine wichtige Rolle (Mahlert et al., 2006). In *S. cerevisiae* übernimmt die kleine GTPase Cdc42 die Funktion des molekularen Schalters in diesen Prozessen. In *U. maydis* konnten sechs Mitglieder der Rho/Rac/Cdc42 Familie identifiziert werden. Unter ihnen befinden sich, neben vier Rho-Homologen, auch Homologe der hoch konservierten GTPasen Cdc42 und Rac1. Diese Situation unterscheidet *U. maydis* von den Hefemodellsystemen, da sowohl in *S. cerevisiae* als auch in *S. pombe* nur ein Cdc42-Homolog, aber kein Rac1-Homolog, vorhanden ist.

#### Die kleine GTPase Cdc42 in *U. maydis*

Cdc42 ist in *U. maydis* ein nicht-essentielles Protein. *cdc42*-Deletionsmutanten sind in der Lage normal zu knospen, zeigen allerdings leichte Defekte in der Zellmorphologie sowie bei der Zelltrennung auf (Mahlert et al., 2006). In *U. maydis* findet die Zelltrennung durch die Ausbildung von zwei aufeinander folgenden Septen statt. Diese beiden Septen grenzen eine Fragmentierungszone ab, an welcher die Tochterzelle bei der Zelltrennung von der Mutterzelle abgelöst wird (Weinzierl et al., 2002).  $\Delta cdc42$ -Zellen bilden "bäumchen"-artige Zellaggregate, die jeweils durch ein einzelnes Septum miteinander verbunden sind und im Vergleich zu Wildtyp-Zellen deutlich verlängert sind (siehe Abb. 1.9). Cdc42 bildet zusammen mit den sogenannten Don (Donut shaped colonies) Proteinen ein Signalmolekül (Weinzierl et al., 2002). *don1* kodiert für einen Guanin-Nukleotid-Austausch-Faktor der Dbl-Familie und katalysiert spezifisch den Nukleotid-Austausch an Cdc42. Dieses Protein bildet somit den Startpunkt der Signalkaskade und übernimmt eine entscheidende Funktion in der Bildung des sekundären Septums. Der Deletionsphänotyp von *don1* gleicht dem Zelltrennungsdefekt der *cdc42*-Mutante und kann durch Expression eines konstitutiv aktiven Allels von *cdc42* komplementiert werden (Mahlert et al., 2006). Ein möglicher Effektor von Cdc42-GTP in dieser Signalkaskade ist vermutlich das Formin Dia1. Eine Überexpression von Cdc42 führt im Wildtyphintergrund zu keinen morphologischen Auswirkungen (Mahlert et al., 2006). Weiterhin können *cdc42*-Mutanten nicht mehr filamentös wachsen, was dazu führt, dass *cdc42*-Mutanten apathogen sind (Mahlert et al., 2006).

#### Die kleine GTPase Rac1 in *U. maydis*

Wie Cdc42, ist auch die kleine GTPase Rac1 in *U. maydis* kein essentielles Protein. Allerdings ist eine Doppeldeletion beider Proteine letal (Mahlert et al., 2006). Möglicherweise ist dies auf

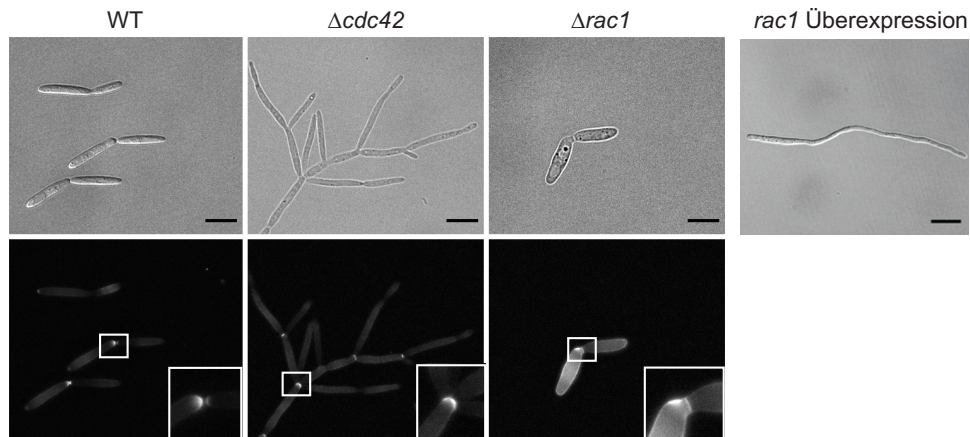


Abbildung 1.9: **Morphologie von *cdc42*- und *rac1*-Mutanten in *U. maydis*.**

Im haploiden Zustand weisen Wildtyp-Zellen eine ovale, gestreckte Zellform auf. Die Zellen vermehren sich durch Knospung und trennen sich nach Ablauf der Mitose an einer von zwei Septen begrenzten Fragmentierungszone. Während Deletionsmutanten von Cdc42 einen Zytokinesedefekt aufweisen, führt die Deletion der nah verwandten GTPase Rac1 zu starken Defekten in der Zellmorphologie und Zellpolarität. Eine Überexpression von Rac1 führt hingegen zur Induktion von filamentösem Wachstum. Der Maßstabsbalken beträgt 10  $\mu\text{m}$ .

eine teilweise redundante Funktion der beiden Proteine zurückzuführen. Entgegen dieser gemeinsamen Funktion weist die Deletionsmutante von *rac1* einen anderen Phänotyp auf, als *cdc42*-Mutanten. Die Deletion von *rac1* beeinträchtigt in *U. maydis* die Knospenbildung und die Zellpolarisierung (siehe Abb. 1.9).  $\Delta\text{rac1}$ -Zellen bilden keine regulären Knospen, sondern die Zellen vergrößern sich und teilen sich durch die Ausbildung eines in der Mitte der Zelle eingezogenen Septums, ähnlich wie *S. pombe*. Während der *rac1*-Deletionsstamm nicht mehr in der Lage ist, Filamente auszubilden und damit, wie auch Cdc42, apathogen ist, führt die Überexpression des Proteins in haploiden Zellen zur unmittelbaren Induktion des filamentösen Wachstums. Diese Filamente ähneln den durch das bE/bW-Heterodimer induzierten Filamenten (Mahlert et al., 2006)). Der beobachtete Polaritätsdefekt und die Fähigkeit Filamente zu induzieren, deutet darauf hin, dass Rac1 in *U. maydis* eine zentrale Funktion bei der Etablierung und Aufrechterhaltung der Polaritätsachse übernimmt.

### 1.4.3 RhoGEFs in *Ustilago maydis*

In der Genomsequenz von *U. maydis* konnten insgesamt neun Guanin-Nukleotid-Austausch-Faktoren identifiziert werden, die zur Dbl-Familie gehören (García-Pedrajas et al., 2008). Unter ihnen weisen einige Sequenzähnlichkeiten zu RhoGEFs aus *S. cerevisiae* auf, wie z.B. die nach ihren Hefe verwandten benannten Proteine Cdc24, Rom1 und Rom2. Andere sind mit RhoGEFs aus höheren Organismen verwandt. So zeigt beispielsweise Don1 eine Sequenzähnlichkeit zum menschlichen Protein FGD1. Insbesondere das Vorhandensein dieser zu humanen RhoGEFs verwandten Proteine, zusammengekommen mit der Anwesenheit von Rac1 und Cdc42, machen *U. maydis* zu einem interessanten Modellorganismus für die Untersuchung von RhoGEF-Spezifität und Regulation. Von den neun potentiellen RhoGEFs sind bisher nur Don1, Cdc24 und Intersectin näher charakterisiert.

## 1 Einleitung

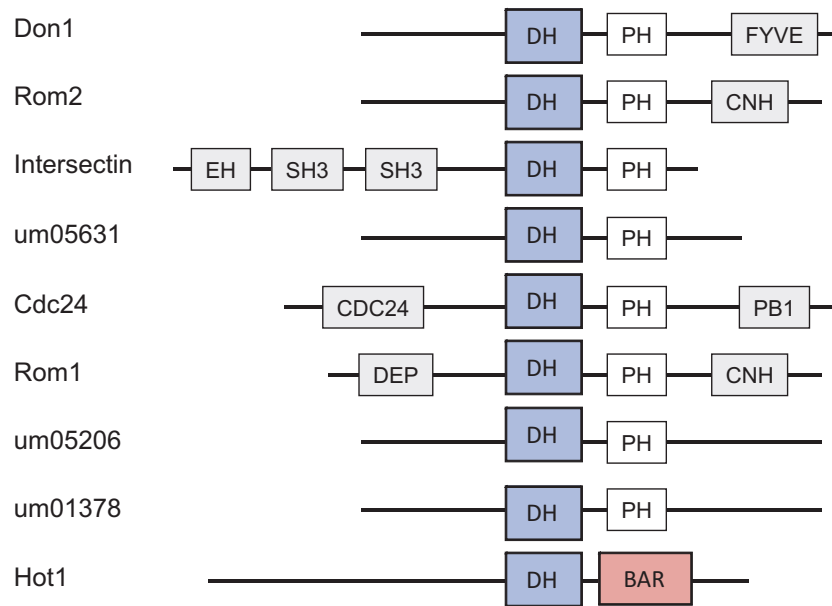


Abbildung 1.10: **RhoGEFs der Dbl-Familie in *U. maydis*.**

Im Genom von *U. maydis* konnten bisher neun Proteine identifiziert werden, die eine für RhoGEFs der Dbl-Familie charakteristische Dbl-Homologie (DH)-Domäne aufweisen und damit als potentielle RhoGEFs gelten können. Von diesen wurden bisher die Proteine Don1, Cdc24 und Its1 beziehungsweise Hot1 im Zuge dieser Arbeit näher untersucht.

### Der RhoGEF Don1 in *U. maydis*

Der RhoGEF Don1 wurde zunächst als Zellteilungs-Mutante identifiziert (Weinzierl et al., 2002). *don1*-Deletionsmutanten zeigen einen ähnlichen Zellteilungsdefekt, wie  $\Delta cdc42$ -Mutanten. Während Wildtyp-Zellen sich durch die Ausbildung von zwei aufeinander folgenden Septen voneinander trennen, sind  $\Delta don1$ -Zellen, wie auch  $\Delta cdc42$ -Zellen, nicht mehr dazu in der Lage, das zweite Septum korrekt auszubilden (Weinzierl et al., 2002). Der RhoGEF Don1 ist ein Cdc42-spezifischer RhoGEF (Hlubek et al., 2008) und reguliert über die Aktivierung von Cdc42 die Bildung des sekundären Septums in *U. maydis*. Neben der für einen RhoGEF charakteristischen katalytischen DH-Domäne und angrenzenden PH-Domäne enthält Don1 zusätzlich eine C-terminale FYVE-Zinkfingerdomäne. Eine solche Domänenorganisation ist typisch für RhoGEFs der FGD1-Familie (Pasteris et al., 1997). Der FYVE-Zinkfinger kommt in vielen Proteinen vor, die an frühe Endosomen binden (Driscoll and Vuidepot, 1999). Die FYVE-Domäne von Don1 bindet an das Phospholipid PtdIns(3)P und lokalisiert über diese Bindung Don1 an Endosomen. Diese Lokalisation ist notwendig, da der Verlust der FYVE-Domäne zu einem Funktionsverlust von Don1 führt (Schink and Bölker, 2009). Die Don1-beladenen Endosomen akkumulieren auf der Tochterseite des primären Septums. In einem postulierten Modell führt die Don1-vermittelte Rekrutierung von Cdc42 an Endosomen zu einer Aktivierung der Cdc42-abhängigen Signalkaskade, die die Bildung des sekundären Septums initiiert (Schink and Bölker, 2009).

## Der RhoGEF Cdc24 in *U. maydis*

Der RhoGEF Cdc24 ist in *U. maydis* ein essentielles Protein. Eine Depletion dieses RhoGEFs führt zum Verlust der Zellpolarität und zu abgerundeten Zellen, die sich nicht mehr korrekt teilen können. In *S. cerevisiae* katalysiert Cdc24 den Nukleotid-Austausch an der kleinen GTPase Cdc42. Cdc24 und Cdc42 bilden zusammen mit dem Gerüstprotein Bem1, sowie mit den p21-aktivierten Kinasen Ste20 und Cla4 einen Signalkomplex an der Spitze und vermitteln polares Wachstum (Pruyne and Bretscher, 2000b). In *U. maydis* handelt es sich bei Cdc24 um einen Rac1-spezifischen RhoGEF, der allerdings in geringem Maß auch eine Aktivität gegenüber Cdc42 aufweist (Schink, 2010). Während des polaren Wachstums von *U. maydis* rekrutiert Cdc24 die GTPase Rac1 zusammen mit der PAK-Kinase Cla4 in einen durch das Gerüstprotein Bem1 koordinierten Komplex. Dieser Komplex lokalisiert an der polar wachsenden Spitze. Auch eine Überexpression von Cdc24 führt zur Induktion von filamentösem Wachstum, ähnlich wie die Überexpression von Rac1 (Frieser et al., 2011).

### 1.4.4 Spezifitätsdetermination von kleinen GTPasen in *Ustilago maydis*

In *U. maydis* zeigen die beiden kleinen GTPasen Cdc42 und Rac1 eine sehr hohe Sequenzähnlichkeit von 66,8 %. Allerdings führt die Deletion der einzelnen GTPasen zu völlig verschiedenen Phänotypen (siehe Abb. 1.9), was auf eine Beteiligung an unterschiedlichen Signalkaskaden hindeutet. Dennoch scheinen die beiden Proteine auch in einem gemeinsamen Signalweg mitzuwirken, denn eine Doppeldeletion der beiden GTPasen ist letal (Mahlert et al., 2006).

Aufgrund der hohen Sequenzähnlichkeit und der zum Teil redundanten Funktion der beiden GTPasen, stellte sich die Frage, wie Spezifität innerhalb der Cdc42- und Rac1-spezifischen Signalkaskaden sichergestellt wird. Es konnte bereits eine Spezifitätsdomäne von Cdc42 und Rac1 eingegrenzt werden (Hlubek et al., 2008). Diese liegt im Bereich der sogenannten Effektorbindeschleife und bildet ein antiparalleles  $\beta$ -Faltblatt, welches als Interaktionsfläche für viele Effektoren, aber auch für RhoGEFs gilt. Eine Eingrenzung dieser Domäne zeigte, dass eine einzelne Aminosäure innerhalb dieser Region wichtig ist, für die Unterscheidung zwischen Cdc42 und Rac1 durch RhoGEFs (Hlubek et al., 2008). Diese Aminosäure liegt an Position 56 der GTPase und ist zwischen verschiedenen Spezies hoch konserviert. Alle Cdc42-Proteine enthalten ein Phenylalanin an dieser Position, während alle Rac1-Proteine ein Tryptophan besitzen.

In biochemischen Studien konnte gezeigt werden, dass ein Wechsel der Aminosäure an Position 56 zwischen Cdc42 und Rac1 in *U. maydis* zu einem Wechsel der Spezifität der bisher charakterisierten RhoGEFs Don1, Its1 und Cdc24 führt (Hlubek et al., 2008; Hlubek, 2008; Schink, 2010). Auch in anderen Systemen diskriminieren RhoGEFs der Dbl-Familie und der Dock180-Familie über die Aminosäure an Position 56 zwischen Cdc42 und Rac1 (Gao et al., 2001; Karnoub et al., 2001; Snyder et al., 2002; Wu et al., 2011; Kulkarni et al., 2011). So führt beispielsweise der Aminosäureaustausch zwischen Cdc42 und Rac1 dazu, dass der Rac1-spezifische RhoGEF Ti-am1 aus dem humanen System den Nukleotid-Austausch an Rac1<sup>W56F</sup> nicht mehr katalysieren kann (Gao et al., 2001; Karnoub et al., 2001). Dahin gegen kann der humane Cdc42-spezifische RhoGEF INTS1 Rac1<sup>W56F</sup> effektiv aktivieren (Karnoub et al., 2001).

## 1.5 Zielsetzung

Kleine GTPasen fungieren als molekulare Schalter in komplexen Signal-Netzwerken. Ein wichtiges Problem bei dem Verständnis der Signalweiterleitung durch kleinen GTPasen ist die Frage, wie bei der Aktivierung eines solchen zentralen Schalters innerhalb komplexer Netzwerke sichergestellt wird, dass der richtige Signalweg aktiviert wird. Die Aktivierung von kleinen GTPasen erfolgt über einer Vielzahl von unterschiedlichen RhoGEFs. Im menschlichen System sind aktuell etwa 20 verschiedene GTPasen bekannt. Demgegenüber stehen allerdings mehr als 70 unterschiedliche RhoGEFs (Garcia-Mata and Burridge, 2007). Im aktiven GTP-gebundenen Zustand interagieren kleine GTPasen mit einer ebenso großen Anzahl an Effektoren, die an der Regulation einer Vielzahl von unterschiedlichen Prozessen in der Zelle beteiligt sind. Kleine GTPasen können von verschiedenen RhoGEFs aktiviert werden und können wiederum mit unterschiedlichen Effektormolekülen interagieren. Gleichzeitig kann ein RhoGEF verschiedene GTPasen aktivieren.

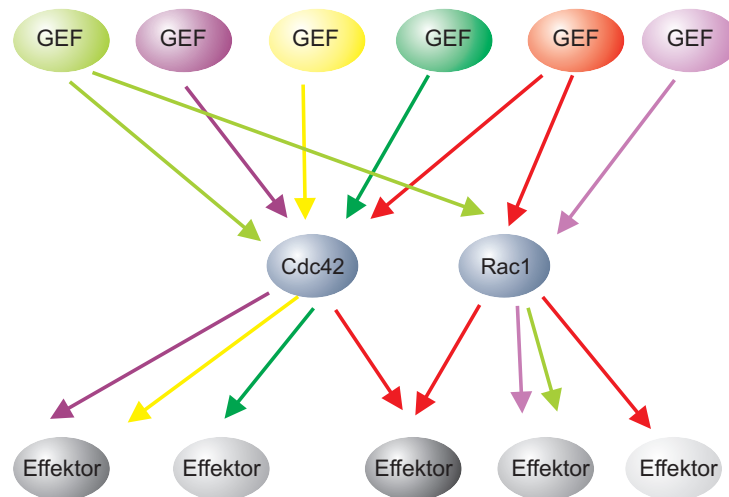


Abbildung 1.11: **Kleine GTPasen fungieren als molekulare Schalter in komplexen Netzwerken.**

Kleine GTPasen übernehmen die Rolle als molekulare Schalter in komplexen Signal-Netzwerken. So kann eine GTPase von verschiedenen RhoGEFs aktiviert werden und gleichzeitig mit einer Vielzahl unterschiedlicher Effektormolekülen interagieren.

Auch in *U. maydis* übersteigt die Zahl der RhoGEFs die Anzahl der kleinen GTPasen. Es konnten bisher 6 RhoGTPasen und 11 RhoGEFs identifiziert werden. Dieses Ungleichgewicht wirft eine Anzahl von Fragen auf. Da kleine GTPasen in einer Vielzahl von Signalkaskaden aktiv sind, wird davon ausgegangen, dass die verschiedenen RhoGEFs sehr spezifisch die Aktivierung einer GTPase bei einer bestimmten zellulären Funktion bzw. in einem bestimmten zellulären Kontext regulieren. Jeder RhoGEF reguliert also einen Teilaspekt der von einer GTPase kontrollierten Prozesse. Ein Aspekt der vorliegenden Arbeit war die Analyse des ungewöhnlichen RhoGEFs Hot1. RhoGEFs der Dbl-Familie besitzen ein charakteristisches Domänen-Motiv, bestehend aus einer katalytischen DH-Domäne und einer angrenzenden Membran-assoziierten PH-Domäne. Im Gegensatz dazu besitzt Hot1 anstelle einer PH-Domäne eine BAR-Domäne. Es sollte zum einen untersucht werden, welche GTPase von diesem RhoGEF aktiviert wird, und welche zel-

luläre Funktion der GTPase von diesem RhoGEF reguliert wird. Aufgrund des ungewöhnlichen Protein-Lipid-Bindemotivs stellte sich weiterhin die Frage, welche Rolle dieses Proteinmotiv für die Funktion von Hot1 spielt. In diesem Kontext sollten auch verwandte Proteine mit einer ähnlichen Protein-Lipid-Interaktionsdomäne analysiert werden.

Da multiple RhoGEFs für eine GTPase existieren, jedoch jeder dieser RhoGEFs lediglich einen Teilaspekt aller Funktionen einer GTPase reguliert, stellte sich die Frage, wie Spezifität innerhalb unterschiedlicher Signalkaskaden generiert wird und wie sichergestellt wird, dass auf einen bestimmten Stimulus eine spezifische Signalantwort erfolgt. Dies ist umso mehr von Bedeutung, da z.B. die beiden GTPasen Cdc42 und Rac1 der Rho-Familie eine hohe Sequenzähnlichkeit aufweisen (im menschlichen System  $\approx 72\%$ ). Ein RhoGEF muss daher nicht nur selektiv einen der multiplen von einer GTPase aktivierten Signalweg regulieren, sondern muss dazu in der Lage sein, zwischen seinem eigentlichen Zielprotein und nah verwandten, strukturell sehr ähnlichen GTPasen zu unterscheiden, um eine Fehlaktivierung von falschen Signalkaskaden zu verhindern. Eine wichtige Rolle bei der Unterscheidung zwischen verwandten GTPasen spielt die konservierte Aminosäure an Position 56 der GTPasen. Alle bekannten Cdc42-Proteine enthalten ein Phenylalanin an dieser Position, während alle Rac1-Proteine ein Tryptophan besitzen. Es konnte gezeigt werden, dass viele RhoGEFs der Dbl- und der DOCK180-Familie über diese Aminosäure zwischen Cdc42 und Rac1 unterscheiden (Gao et al., 2001; Karnoub et al., 2001; Snyder et al., 2002; Wu et al., 2011; Kulkarni et al., 2011). Auch in *U. maydis* konnte bereits in früheren Arbeiten gezeigt werden, dass diese Aminosäure für die RhoGEFs Don1, Cdc24 und Its1 für die Unterscheidung von Cdc42 und Rac1 kritisch ist. Der Hauptfokus dieser Arbeit lag daher darauf, zu untersuchen, welche GTPase von Hot1 aktiviert wird und ob bzw. wie Hot1 zwischen seinem Zielprotein und nah verwandten GTPasen unterscheidet.

Darüber hinaus sollte untersucht werden, wie sich unterschiedliche GTPasen in komplexe Signal-Netzwerke einordnen und welchen Einfluss ihre subzelluläre Lokalisierung auf ihre spezifische Funktionen hat. Hierbei stellte sich insbesondere die Frage, warum die Funktionen von nah verwandten GTPasen derartig unterschiedlich und spezialisiert sind. Einige Organismen haben die Anzahl ihrer GTPasen stark reduziert. So hat beispielsweise *S. cerevisiae* sein Rac1-Homolog im Laufe der Evolution verloren. Daher stellte sich die Frage, ob sich synthetisch eine GTPase generieren lässt, welche die Eigenschaften von mehreren GTPasen vereint. Da Cdc42 und Rac1 hoch konserviert sind und in *U. maydis* zumindest eine überlappende essentielle Funktion haben, aber dennoch in unterschiedlichen Signal-Netzwerken aktiv sind, sollte versucht werden, diese Komplexität künstlich zu verringern und die verschiedenen Funktionen auf ein Protein zu übertragen. Hierzu sollte ein Protein generiert werden, dass von allen bekannten RhoGEFs aktiviert wird und gleichzeitig möglichst unselektiv viele bzw. alle Effektoren aktiviert. Aufgrund des komplexen Lebenszyklus von *U. maydis* erschien es nicht besonders wahrscheinlich, dass sich alle Funktionen auf ein einzelnes Protein abbilden lassen, daher stellte sich die Frage, welche Funktionen spezifisch für Cdc42 bzw. Rac1 sind und sich nicht ohne weiteres auf eine einzelne GTPase übertragen lassen.



## 2 Ergebnisse

### 2.1 Charakterisierung des Rho-GEFs Hot1 in *U. maydis*

Im Genom von *U. maydis* konnten insgesamt neun potentielle RhoGEFs der Dbl-Familie identifiziert werden, von denen nur Don1, Cdc24 und Its1 bisher näher charakterisiert wurden. Es gibt unter diesen Proteinen einen potentiellen RhoGEF, Hot1, welcher zwar die charakteristische DH-Domäne besitzt, jedoch an Stelle der angrenzenden PH-Domäne eine Bin-Amphiphysin-Rvs (BAR)-Domäne aufweist. Hot1 zeigt, im Hinblick auf seine Proteinsequenz und Domänenorganisation, große Ähnlichkeit zu dem Protein TUBA aus *H. sapiens* (E-Value  $3e^{-25}$ ). Aus diesem Grund wurde das *U. maydis* Protein Homolog-of-TUBA 1 (Hot1) genannt. Die Domänenstruktur des menschlichen TUBA beinhaltet, neben dem DH-BAR Tandem-Motiv, vier N-terminale Src-Homologie 3 (SH3)-Domänen und zwei zusätzliche C-terminale SH3-Domänen. Wie in Abbildung 2.1 dargestellt, besitzt Hot1 eine ähnliche Anordnung der funktionellen Domänen. Allerdings fehlen in Hot1 die N- und C-terminalen SH3-Domänen. Interessanterweise weist die katalytische DH-Domäne von Hot1, im Vergleich zu dem menschlichen TUBA eine, etwa 200 Aminosäuren große Insertion innerhalb der DH-Domäne auf (Abb. 2.1). Diese Insertion hat vermutlich aber keinen Einfluss auf die Domänenfunktion. In der Spalthefe *S. pombe* konnte der RhoGEF, Gef1p, identifiziert werden. Dessen DH-Domäne zeigt ebenfalls eine hohe Sequenzähnlichkeit zur DH-Domäne von Hot1 und TUBA. Allerdings fehlt in Gef1p die Membran-bindende BAR-Domäne (Abb. 2.1). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass Gef1p über seine C-terminale Region mit dem BAR-Domänen Protein Hob3p interagiert. Durch diese zusätzliche BAR-Domäne wird vermutlich die fehlende PH-Domäne von Gef1p ersetzt. So entsteht eine ähnliche Domänenstruktur wie bei klassischen RhoGEFs, bestehend aus katalytischer DH-Domäne und angrenzender Membranbindedomäne (Coll et al., 2007).

#### 2.1.1 Hot1 lokalisiert an der zukünftigen Knospungsstelle und am "Mother-Bud-Neck"

Erste Hinweise auf die Funktion von Hot1 in *U. maydis* wurden durch Untersuchungen einer Deletionsmutante von *hot1* erhalten. Diese *hot1*-Deletionsmutante zeigte im Vergleich zum Wildtyp eine leichte Veränderung der Zellmorphologie. Im haploiden Zustand weisen Wildtyp-Zellen eine ovale, gestreckte Zellform auf. Die Zellen vermehren sich durch Knospung und trennen sich nach Ablauf der Mitose an einer von zwei Septen begrenzten Fragmentierungszone (Weinzierl et al., 2002).  $\Delta hot1$ -Mutanten zeigen ebenfalls eine ovale Zellmorphologie und sind fähig zu knospen. Sie weisen jedoch häufig eine zusätzliche Einbuchtung an einem der beiden Zellpole auf (siehe Abb. 2.2). Hierbei scheint es sich um eine bereits angelegte Einschnürung für eine

## 2 Ergebnisse

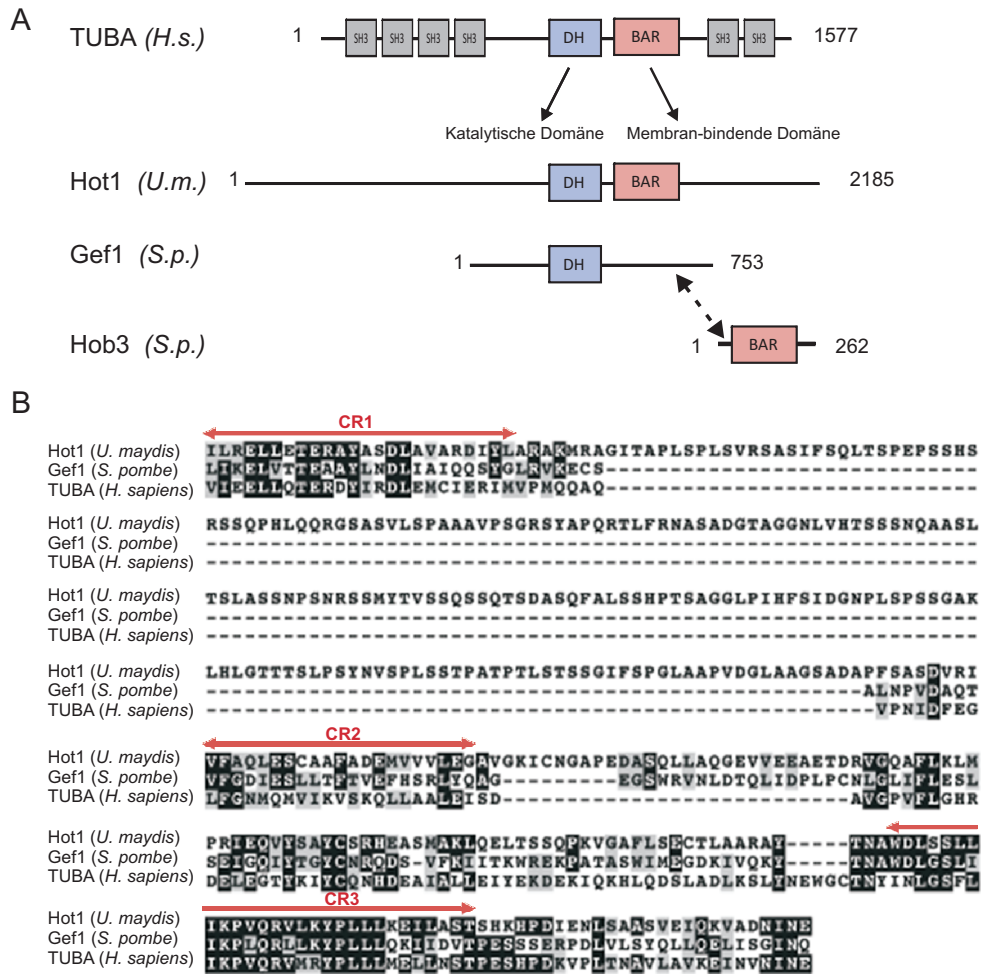


Abbildung 2.1: Vergleich der homologen BAR-Domänen GEFs aus *Homo sapiens*, *Ustilago maydis* und *Schizosaccharomyces pombe*.

(A) Dargestellt ist die Domänenstruktur der BAR-Domänen RhoGEFs TUBA, Hot1 und Gef1p. Der humane RhoGEF TUBA besitzt neben dem charakteristischen DH-BAR Motiv zusätzliche N- und C-terminale SH3 Domänen, die der Protein-Protein Interaktion dienen. Der verwandte RhoGEF Gef1p aus *S. pombe* besitzt hingegen keine für RhoGEFs charakteristische Membran-bindende Domäne, sondern besteht nur aus der katalytischen DH-Domäne. Allerdings interagiert Gef1p mit dem BAR-Domänen Protein Hob3p, so dass durch diese Interaktion ein vollständiges DH-BAR Tandem-Motiv entsteht. (B) Sequenzvergleich der katalytischen DH-Domäne des menschlichen TUBA-Proteins und der verwandten Proteine aus *U. maydis* und *S. pombe*. Auffällig ist, dass die DH-Domäne von Hot1 eine ausgedehnte Insertion zwischen der konservierten Region CR1 und CR2 aufweist.

zweite Knospe zu handeln. In *U. maydis* wird zur gleichen Zeit normalerweise nur eine Knospe pro Mutterzelle gebildet. Es kommt nur in sehr seltenen Fällen (weniger als 1 Prozent) vor, dass eine zweite Knospe gebildet wird, bevor sich die existierende Tochterzelle von der Mutterzelle getrennt hat. Neue Knospen werden bevorzugt am gleichen Zellpol wie die frühere Knospe gebildet. Etwa 10 Prozent der  $\Delta hot1$ -Zellen bilden hingegen eine neue Knospe, bevor sich die alte Knospe vollständig von der Mutterzelle getrennt hat. Diese zweite Knospe findet sich, im Gegensatz zu Wildtyp-Zellen, am gegenüberliegenden Zellpol. Neben diesem Effekt zeigen die *hot1*-Deletionsmutanten keine weiteren auffälligen Defekte.

Nicht nur die Deletion sondern auch die Überexpression von RhoGEFs kann durch die Überak-

tivierung von Signalkaskaden zu drastischen Phänotypen führen. Mit Hilfe von Überexpressionen können häufig Rückschlüsse auf die zelluläre Funktion gezogen werden. Um auf diese Weise etwas über die Funktion von Hot1 zu erfahren, wurde eine konditionale Mutante hergestellt. Die Überexpression von Hot1 zeigte jedoch keinen Phänotyp (nicht gezeigt).

Da die vorhergehenden Untersuchungen nur wenig Rückschlüsse auf die zelluläre Funktion von Hot1 gaben, wurde die Lokalisierung von Hot1 näher analysiert. Dazu wurde eine C-terminale GFP-Fusion dieses Proteins unter Kontrolle des endogenen Promotors exprimiert. Mikroskopische Untersuchungen der resultierenden Stämme zeigten allerdings, dass das native Expressionslevel dieses Proteins zu schwach ist, um die GFP-Fusion zu detektieren (nicht gezeigt). Aus diesem Grund wurde der Leserahmen von *hot1*-GFP unter die Kontrolle des Arabinose-induzierbaren *crg*-Promotors gebracht. Die resultierenden Stämme zeigten eine ausreichend starke Fluoreszenz und wurden im Folgenden mikroskopisch charakterisiert. Aufgrund des leichten Defekts bei der Auswahl der Knospungsstelle und der zeitlichen Regulation der Knospung, wurden die Hot1-GFP exprimierenden Zellen zunächst zu verschiedenen Zeitpunkten während der Zytokinese untersucht. Wie in Abbildung 2.2 dargestellt, lokalisiert Hot1-GFP in Zellen ohne Knospe an einem der beiden Zellpole. Während der Zellteilung ist Hot1 am "*Mother-Bud-Neck*", dem Übergang zwischen Mutter- und Tochterzelle, zu erkennen und bildet dort eine Sanduhrenförmige Struktur aus. Zusätzlich lokalisiert Hot1 während des gesamten Zellzyklus an der Plasmamembran und ist dort an punktförmigen Strukturen unter der Membran angereichert. BAR-Domänen finden sich häufig in Proteinen, die am Vesikeltransport und der Endozytose beteiligt sind. Durch ihre positiv geladene konkave Oberfläche können BAR-Domänen an Vesikeln oder Membranen mit einer definierten Krümmung binden (Peter et al., 2004). Bei den beobachteten Punkten könnte es sich daher um Vesikel mit einem definierten Durchmesser handeln, die von der BAR-Domäne von Hot1 erkannt und gebunden werden. Die Nähe zur Plasmamembran macht es wahrscheinlich, dass es sich um sogenannte "*clathrin-coated pits*" handelt. Aus anderen Systemen ist bekannt, dass BAR-Domänen unter anderem an diesen frühen endozytotischen Strukturen lokalisieren (Ren et al., 2006; Peter et al., 2004).

Aus der Untersuchung menschlicher Zellen ist bekannt, dass das Hot1-Homolog TUBA als Gerüst-Protein fungiert. Über die C-terminalen SH3-Domänen bindet TUBA die GTPase Dynamamin, welche eine wichtige Rolle in der Endozytose spielt. Mit Hilfe seiner strukturellen Komplexität stellt TUBA eine Verbindung zwischen Endozytose, den Signalwegen der GTPase Cdc42 und der Organisation des Aktin-Zytoskeletts her (Salazar et al., 2003). Ich konnte bereits in meiner Diplomarbeit zeigen, dass Hot1 in *U. maydis* vermutlich keine Rolle in der Endozytose spielt. In Säugetieren reguliert TUBA, unabhängig von seiner Funktion während der Endozytose, auch andere Aktin-organisierende Prozesse (Salazar et al., 2003). Aus diesem Grund wurde analysiert, ob Hot1 mit Aktinstrukturen interagiert. Um die Aktinstrukturen in *U. maydis* sichtbar zu machen, wurde ein Aktinmarker (*Lifeact*) benutzt, der aus den ersten 17 Aminosäuren des ABP140-Proteins aus *S. cerevisiae* abgeleitet wurde (Riedl et al., 2008). GFP-markiertes Hot1 wurde zusammen mit *Lifeact*-RFP exprimiert. Bei der mikroskopischen Untersuchung fiel auf, dass Hot1 noch weiterhin an den Punkten unter der Plasmamembran lokalisiert. Allerdings war die Sanduhrenförmige Struktur zwischen Mutter- und Tochterzelle nicht mehr zu sehen (siehe Abb. 2.2). Eine Erklärung für die fehlende Lokalisierung innerhalb der Teilungsebene wäre, dass

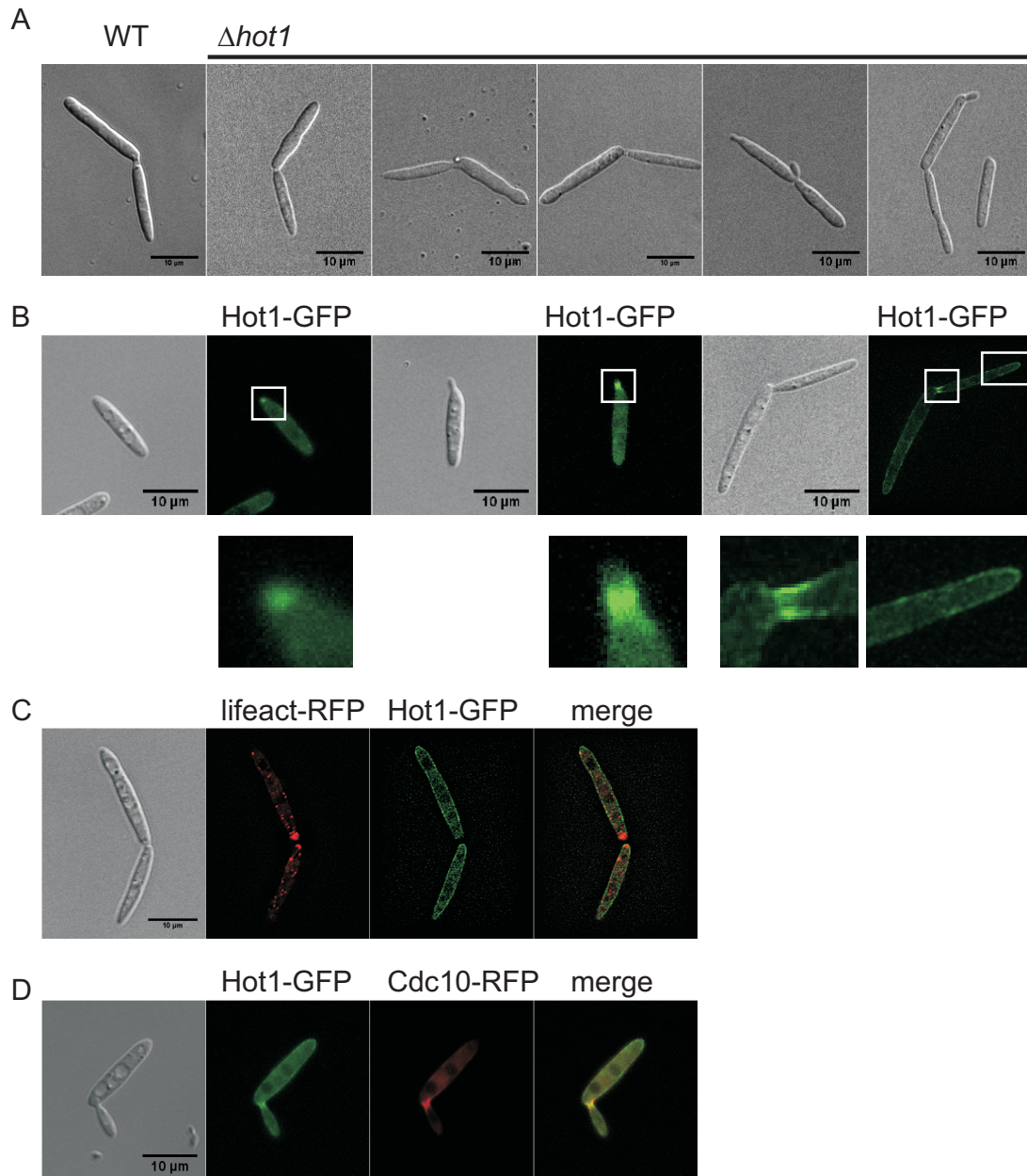


Abbildung 2.2: Charakterisierung des RhoGEFs Hot1 in *U. maydis*.

(A) Eine Deletion von *hot1* führt zu einem leichten morphologischen Defekt. Im Vergleich zum Wildtyp weisen die Zellen eine leicht veränderte Zellform auf. Es ist häufig mehr als eine Knospe zu erkennen. (B) Um die intrazelluläre Lokalisation von Hot1 zu untersuchen wurde eine C-terminale GFP-Fusion von *hot1* am genomischen Locus generiert. Aufgrund des geringen Expressionslevels von *hot1* wurde die C-terminale GFP-Fusion von *hot1* unter Kontrolle des Arabinose-induzierbaren *crg*-Promotors überexprimiert. Es zeigte sich, dass Hot1 an der zukünftigen Knospungsstelle lokalisiert und während der Zellteilung am sogenannten "Mother-Bud-Neck" verbleibt. Außerdem ist eine Lokalisation an kleinen Partikeln unter der Plasmamembran zu erkennen. (C) In einem Hot1-GFP exprimierenden Stamm wurde *Lifeact*-RFP exprimiert und die Lokalisation des Aktin-Zytoskellets mit der Lokalisation von Hot1 verglichen. Es lassen sich deutliche Akkumulationen von kortikalen Aktinpatches erkennen. Während der Septierung befinden sich in der Septierungszone deutliche Aktin-Akkumulationen. Auffällig ist, dass keine Lokalisation von Hot1 an der Septierungszone auszumachen ist, während die Lokalisation an den Partikeln unter der Plasmamembran weiterhin besteht. (D) Da die Lokalisation von Hot1 der zellulären Lokalisation von Septinen sehr ähnelt, wurde ein Stamm generiert, in dem RFP-Cdc10 unter Kontrolle des *etef*-Promotors und Hot1-GFP unter Kontrolle des *crg*-Promotors exprimiert wurde. Hierbei zeigte sich, dass Hot1 mit dem Septin Cdc10 kolokalisiert.

Hot1 das Aktinzytoskelett benötigt, um an der zukünftigen Knospungsstelle zu lokalisieren und dort zu verbleiben. Möglicherweise blockiert das *lifeact*-RFP-Fusionsprotein die Aktin-Bindung von Hot1, so dass Hot1 nicht mehr korrekt lokalisieren kann.

Bei der mikroskopischen Analyse von Hot1 fiel auf, dass die Lokalisation der Hot1-GFP-Fusion im "*Mother-Bud-Neck*" sehr ähnlich zur Lokalisation von Septinen in *U. maydis* ist (Böhmer et al., 2009). Septine sind GTP-bindende Proteine, die multimerisieren und darüber Filamente ausbilden können. Sie sind in anderen Organismen unter anderem an der Auswahl der Knospungsstelle und an der Organisation des "*Mother-Bud-Neck*" beteiligt (Longtine et al., 1996; Gladfelter et al., 2001; Faty et al., 2002). In *U. maydis* konnte gezeigt werden, dass Septinmutanten starke morphologische Defekte aufweisen und sich durch die Ausbildung eines einzelnen zentralen Septums teilen (Alvarez-Tabarés and Pérez-Martín, 2010). Darüber hinaus ist bekannt, dass in *U. maydis* Septine als Sanduhren-förmige Struktur innerhalb der Teilungsebene lokalisieren (Böhmer et al., 2009). Aus diesem Grund wurde die Lokalisation von Hot1 zusammen mit einem Septin, Cdc10, untersucht. Abbildung 2.2 zeigt einen Stamm, der GFP-Hot1 und das Septin RFP-Cdc10 koexprimiert. Es ist deutlich eine Kolo-kalisation zwischen diesen beiden Proteinen im Bereich des "*Mother-Bud-Neck*" zu erkennen. Aufgrund dieser Lokalisation lag es nahe zu vermuten, dass Hot1 an der Organisation dieser Struktur beteiligt sein könnte. Daher wurde untersucht, ob es eine direkte Interaktion zwischen Hot1 und den Septinen gibt. Hierzu wurden Kopräzipitationsexperimente von Septinen zusammen mit Hot1 durchgeführt. Es konnte allerdings keine direkte Interaktion nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Darüber hinaus ist auch die Organisation der Septinstrukturen in  $\Delta hot1$  nicht gestört (nicht gezeigt). Daher scheint Hot1 keinen direkten Einfluss auf die Septinorganisation zu haben.

### 2.1.2 Die Überexpression von Hot1 supprimiert den Zellteilungsdefekt von $\Delta don1$ Mutanten

Es ist bereits bekannt, dass das humane TUBA im menschlichen System als Cdc42-spezifischer RhoGEF fungiert (Salazar et al., 2003). Die Sequenzähnlichkeit von Hot1 zu TUBA lässt vermuten, dass es sich bei Hot1 ebenfalls um einen Cdc42-spezifischen GEF handelt. In *U. maydis* ist die GTPase Cdc42 an der Zytokinese beteiligt. Die Zelltrennung findet durch die Ausbildung von zwei aufeinander folgenden Septen statt. Diese beiden Septen grenzen eine Fragmentierungszone ab, an welcher die Tochterzelle bei der Zelltrennung von der Mutterzelle abgelöst wird (Weinzierl et al., 2002). Zellen, in denen die kleine GTPase Cdc42 ausgeschaltet ist, zeigen einen Zellseparationsdefekt während des Knospungsprozesses.  $\Delta cdc42$ -Mutanten bilden bäumchen-artige Zellaggregate, welche durch ein einzelnes Septum verbunden sind (Mahlert et al., 2006). Dieser Phänotyp gleicht dem Phänotyp von  $\Delta don1$ -Mutanten. Don1 ist ein Cdc42-spezifischer RhoGEF und wird für die Aktivierung von Cdc42 während der Bildung des sekundären Septums benötigt (Weinzierl et al., 2002). Die Deletion von *don1* lässt sich durch Aktivierung von Cdc42 supprimieren, so kann die Expression von konstitutiv aktivem Cdc42 den Zelltrennungsdefekt von  $\Delta don1$ -Mutanten retten.

Auch die Überexpression der katalytischen Domäne des Cdc42-spezifischen RhoGEFs Its1 ausreichend, um den *don1*-Phänotyp zu supprimieren (Doktorarbeit, Andrea Hlubek). Daher wurde

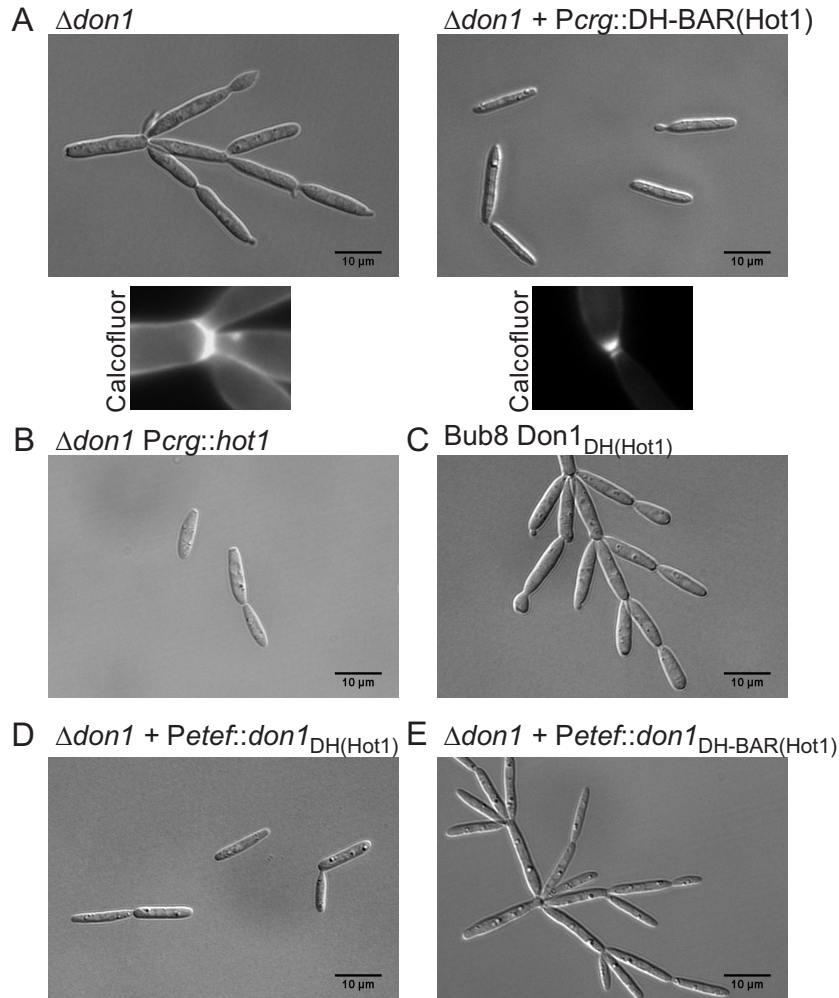


Abbildung 2.3: **Suppression des Zelltrennungsdefektes von  $\Delta don1$ -Mutanten durch Hot1.**

(A) Die DH-BAR-Domäne von Hot1 wurde ektopisch in den *ip*-Lokus integriert und unter Kontrolle des Arabinose-induzierbaren *crg*-Promotors exprimiert. Dies führte zur Suppression des Zelltrennungsdefektes der *don1*- Mutante. Die Calcofluorfärbung zeigt, dass die Suppression des Zelltrennungsdefektes durch die Expression des DH-BAR Motives von Hot1 über die Ausbildung von Doppelsepten erfolgt. (B) In dem *don1*-Deletionsstamm wurde der Leserahmen von *hot1* unter die Kontrolle des *crg*-Promotors gebracht und überexprimiert. Dies führte zur vollständigen Komplementation des Zelltrennungsdefektes. (C) Um zu überprüfen, ob die katalytische DH-Domäne von Hot1 die DH-Domäne von Don1 ersetzen kann, wurde ein chimärer RhoGEF - Don1<sup>DH(Hot1)</sup> - generiert. Dieser wurde am endogenen Locus von *don1* integriert. Das Expressionslevel von Don1<sup>DH(Hot1)</sup> reicht allerdings nicht aus, um die Funktion von Don1 in der Zelle zu übernehmen. (D) Der chimäre GEF Don1<sup>DH(Hot1)</sup> wurde ektopisch in den *ip*-Lokus einer *don1* Deletionsmutante integriert und konstitutiv vom *etef*-Promotor exprimiert. Die Überexpression führt zur Suppression des Zelltrennungsdefektes der *don1*-Mutante. (E) Die konstitutive Expression des chimären RhoGEFs Don1<sup>DH-BAR(Hot1)</sup> in einer *don1*-Deletionsmutante führt nicht zu einer Suppression des Zelltrennungsdefektes.

dieses einfache Testsystem benutzt, um erste Hinweise auf die Spezifität von Hot1 zu bekommen. Wie in Abbildung 2.3 dargestellt, reicht eine Überexpression des DH-BAR Tandem-Motivs von Hot1 aus, um den Zellteilungsdefekt von  $\Delta don1$ -Zellen zu supprimieren. Eine Färbung der Zellwand mit dem chitinspezifischen Fluoreszenzfarbstoff Calcofluor-White zeigt, dass es zur Ausbildung eines sekundären Septums in der Tochterzelle kommt, was die Auflösung der Zellag-



gregate zu Einzelzellen ermöglicht. Dies deutet darauf hin, dass Hot1 vermutlich als RhoGEF für Cdc42 wirken kann und bei Überexpression schon das isolierte DH-BAR-Motive ausreicht, um die Funktion von Don1 zu übernehmen. Die Funktion von Hot1 als RhoGEF für Cdc42 konnte im Rahmen dieser Arbeit auch mit Hilfe von *in vitro* Experimenten bestätigt werden (siehe Abschnitt 2.2.2). Auch die starke Überexpression des vollständigen Hot1 Proteins kann den Zelltrennungsdefekt der  $\Delta don1$ -Mutante supprimieren (Abb. 2.3). Ausgehend von diesem Ergebnis wurde weiterhin untersucht, ob die katalytische DH-Domäne von Hot1 die DH-Domäne von Don1 im Don1 Protein ersetzen kann. Dazu wurde ein chimärer RhoGEF - Don1<sup>DH(Hot1)</sup> - generiert. Diese Experimente wurden von Alina Stiebler im Rahmen einer von der Verfasserin betreuten Bachelorarbeit durchgeführt. Allerdings muss dieser chimäre RhoGEF, Don1<sup>DH(Hot1)</sup>, überexprimiert werden, um den Zelltrennungsdefekt von  $\Delta don1$ -Zellen aufzuheben. Anscheinend reicht die Expression des chimären RhoGEFs durch den endogenen Don1-Promotor nicht aus, um die Funktion von Don1 in der Zelle zu übernehmen (Abb. 2.3). Dies könnte auf eine schlechtere Aktivierung von Cdc42 durch die DH-Domäne von Hot1 zurückgeführt werden. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass die DH-Domäne von Hot1 einem lokalisations-spezifischen Regulationsmechanismus unterliegt, so dass diese katalytische Domäne nur in einem bestimmten subzellulären Kontext aktiv ist. In beiden Fällen bewirkt zwar die Überexpression eine Suppression des Zelltrennungsdefekts von Don1, aber die Expression des chimären RhoGEFs unter endogenen Bedingungen reicht nicht aus, um Cdc42 genauso effektiv zu aktivieren, wie Don1. Von anderen RhoGEFs ist bekannt, dass die PH-Domäne nicht nur der Lokalisation dient, sondern auch einen effektiven Nukleotid-Austausch begünstigt (Rossman et al., 2005, 2002b). Es wäre daher möglich, dass Don1<sup>DH(Hot1)</sup> weniger effektiv ist, da die BAR-Domäne für einen effektiven Nukleotid-Austausch benötigt wird. Beispielsweise könnte die BAR-Domäne an der Stabilisierung des RhoGEF-GTPase-Komplexes beteiligt sein. Aus diesem Grund wurde versucht, neben der DH-Domäne auch die PH-Domäne von Don1 gegen die BAR-Domäne von Hot1 auszutauschen. Interessanterweise kann das resultierende chimäre Don1-Protein, welches die DH-BAR Domäne von Hot1 beinhaltet, den Zelltrennungsdefekt von *don1*-Deletionsmutanten auch bei einer starken Überexpression nicht komplementieren (Abb. 2.3), obwohl das isolierte DH-BAR Motiv diese Funktion übernehmen kann. Vermutlich wird dieser Effekt durch die unterschiedlichen lipidbindenden Domänen von Don1 und Hot1 verursacht, die sich nun in einem Protein vereinen. Während die PH-Domäne an bestimmte Phosphatidyl-Inositol-Phosphate bindet, im Fall von Don1 an PtdIns(3)P, detektiert die BAR-Domäne spezifische Membrankrümmungen. Für die Funktion von Don1 spielt außerdem eine C-terminale FYVE-Domäne eine entscheidende Rolle (siehe Einleitung). Diese FYVE Domäne ist ebenfalls eine lipidbindende Domäne und wird für die Lokalisation an Endosomen benötigt. Es wäre möglich, dass die FYVE-Domäne und die BAR-Domäne um unterschiedliche subzelluläre Lokalisationen konkurrieren und damit die korrekte Funktion des chimären Proteins verhindern.

### 2.1.3 Hot1 dimerisiert mit dem BAR-Domänen Protein Hob3

Der RhoGEF Gef1p aus *S. pombe* zeigt eine hohe Sequenzähnlichkeit zu Hot1 (vergleiche Abb. 2.1). Allerdings fehlt Gef1p, im Vergleich zu Hot1, die Membran-bindende Domäne.

Gef1p interagiert mit dem BAR-Domänen-Protein Hob3p, welches eine Assoziation an Membranen vermittelt. Mittels einer Genomanalyse konnten zwei weitere BAR-Domänen Proteine in *U. maydis* identifiziert werden. Die BAR-Domänen dieser beiden Proteine, UmHob1 und UmHob3, zeigen eine hohe Sequenzähnlichkeit zur BAR-Domäne von Hot1. Im Hinblick auf die Domänenorganisation und Proteinsequenz findet sich ebenfalls eine große Ähnlichkeit zu den gleichnamigen Proteinen aus *S. pombe*. SpHob3p besitzt als einzige funktionelle Gruppe eine BAR-Domäne und interagiert, wie in Abbildung 2.1 gezeigt, mit dem Cdc42-spezifischen RhoGEF Gef1p. SpHob3p zeigt Ähnlichkeit zum menschlichen BIN3 und Rvs161p aus *S. cerevisiae* (Routhier et al., 2001). SpHob3p spielt in *S. pombe* eine Rolle bei der Zytokinese und in der Aktin-Organisation (Coll et al., 2007). SpHob1p besitzt neben einer N-terminalen BAR-Domäne zusätzlich eine C-terminale SH3-Domäne. In *S. pombe* spielt SpHob1p eine Rolle in "Stress-Response"-Prozessen. Es interagiert mit Proteinen, die an der Aktinpolymerisierung beteiligt sind und mit Kinasen, die die Zellpolarität regulieren (Huang et al., 2005). SpHob1p zeigt außerdem strukturelle Ähnlichkeit zu Rvs167p aus Hefe und zum humanen BIN1-Protein (Routhier et al., 2001).

BAR-Domänen formen in der Zelle längliche "bananen-förmige" Homo- oder Heterodimere. Diese Domänen müssen dimerisieren, um ihre Funktion in der Zelle ausführen zu können (Hinshaw and Schmid, 1995; Peter et al., 2004; McMahon and Gallop, 2005). Aus diesem Grund lag die Vermutung nahe, dass auch die BAR-Domäne von Hot1 dimerisieren muss, um spezifisch an Membranen binden zu können. Dies könnte entweder als Homo- oder aber auch als Heterodimer mit Hob1 oder Hob3 geschehen. Daher wurde zunächst getestet, ob die verschiedenen BAR-Domänen-Proteine Homodimere oder eventuell Heterodimere untereinander ausbilden. Dazu wurden mit Hilfe eines Präzipitationsexperiments die verschiedenen Kombinationen auf Dimerisierung getestet. Hob3 und Hob1 sowie die BAR-Domäne von Hot1 wurden als GST-Fusionsproteine in *E.coli* exprimiert und durch Affinitäts-Chromatographie gereinigt. Für die Kopräzipitation wurden gleiche Anteile GST, GST-Hob1, GST-Hob3 sowie GST-Hot1<sup>BAR</sup> mit Proteinextrakten von *U. maydis*-Zellen inkubiert, welche die GFP-markierten Proteine Hob1 und Hob3 sowie eine HA-markierte Version von Hot1 endogen exprimierten. Dimere wurden mit Hilfe von GSH-Agarose präzipitiert und über einen Westernblot nachgewiesen. Wie in Abbildung 2.4 gezeigt, bildet keines der drei BAR-Domänen Proteine Homodimere aus. Allerdings interagiert Hob3 sowohl mit Hob1 als auch mit Hot1. Außerdem ist eine schwache Interaktion von GFP-Hob3 mit GST alleine zu erkennen. Da jedoch die Interaktion mit GST-Hob1 und GST-Hot1 viel stärker ist, kann man daraus schließen, dass Hob3 sowohl mit Hob1 und Hot1 einen Komplex bildet. Dies wurde dadurch untermauert, dass sowohl Hot1-HA als auch Hob1-GFP mit Hob3 kopräzipitieren. Es scheint allerdings keine Hob3 Homodimere zu geben. Die beobachtete schwache Interaktion von Hob3 mit GST-Hob3 lässt sich mit der Interaktion von Hob3 mit GST allein erklären lässt.

Aus anderen Systemen ist bekannt, dass BAR-Domänen mit kleinen GTPasen interagieren können (Habermann, 2004). Auch in *S. pombe* konnte gezeigt werden, dass Hob3p mit der kleinen GTPase Cdc42p interagiert und dass dieses BAR-Domänen Protein außerdem für die Rekrutierung von Cdc42p an die Zellteilungsebene verantwortlich ist (Coll et al., 2007). Um zu überprüfen, ob die BAR-Domänen Proteine Hob1, Hob3 und die BAR-Domäne von Hot1



## 2 Ergebnisse

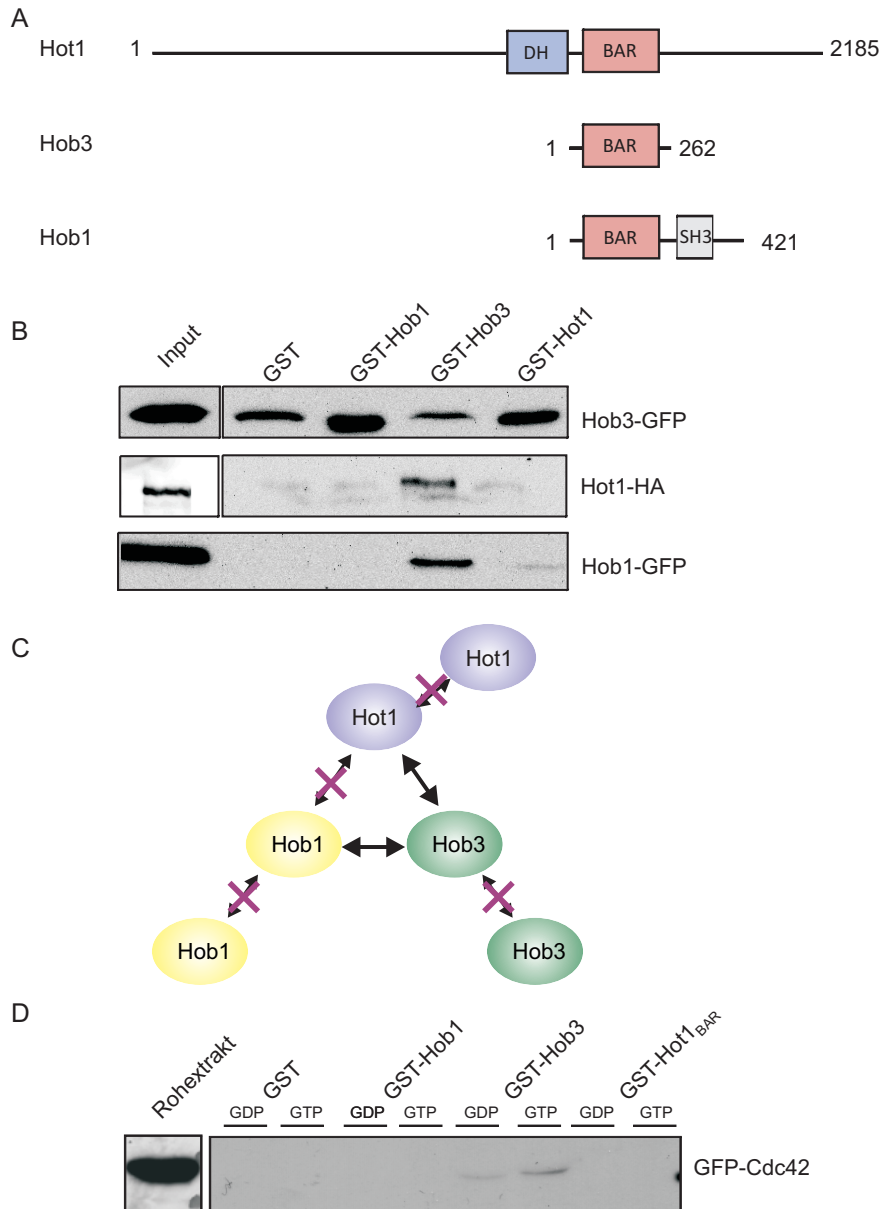


Abbildung 2.4: **Dimerisierungsversuche der BAR-Domänen Proteine Hot1, Hob1 und Hob3.**

(A) Dargestellt ist die Domänenstruktur von Hot1, Hob3 und Hob1. (B) Nachweis von Dimerisierungsvarianten der BAR-Domänen Proteine Hot1, Hob3 und Hob1. Hob3 und Hob1 sowie die BAR-Domäne von Hot1 wurden als GST-Fusionsproteine in *E. coli* exprimiert und durch Affinitäts-Chromatographie gereinigt. Für die Kopräzipitation wurde gleiche Anteile GST, GST-Hob1, GST-Hob3 sowie GST-Hot1<sup>BAR</sup> mit Proteinextrakten von *U. maydis*-Zellen inkubiert, die die GFP-markierten Proteine Hob1 und Hob3, sowie eine HA-markierte Version von Hot1, exprimierten. Dimere wurden mit Hilfe von GSH-Agarose präzipitiert, im SDS-Gel aufgetrennt und auf eine PVDF Membran transferiert. Hob1 und Hob3 wurden mit Hilfe eines monoklonalen GFP-Antikörpers, Hot1 mit monoklonalen HA-Antikörpers nachgewiesen. GFP-Hob3 kopräzipitiert mit GST alleine. Da die Interaktion mit GST-Hob1 und GST-Hot1 viel stärker ist und gleiche Menge eingesetzt wurden, kann geschlossen werden, dass Hob3 sowohl mit Hob1 und Hot1 einen Komplex bildet. Das wird dadurch untermauert, dass Hot1-HA und auch Hob1-GFP mit Hob3 kopräzipitieren. (C) Die schematische Darstellung zeigt die möglichen Dimerisierungspartner der drei verschiedenen BAR-Domänen Proteine. (D) Nachweis der Komplexbildung der Proteine Hob1, Hob3 und Hot1<sup>BAR</sup> mit Cdc42. Für die Kopräzipitation wurden gleiche Anteile GST, GST-Hob1, GST-Hob3 und GST-Hot1<sup>BAR</sup> mit Proteinextrakten von *U. maydis*-Zellen inkubiert, die GFP-Cdc42 unter Kontrolle des eigenen Promotors exprimieren. Proteinextrakte wurden mit GDP oder GTP $\gamma$ S beladen. Dimere wurden mit Hilfe von GSH-Agarose präzipitiert und Cdc42 durch einen Westernblot mit einem monoklonalen GFP-Antikörper nachgewiesen.

mit der kleinen GTPase Cdc42 interagieren, wurde ein weiteres Präzipitations-Experiment durchgeführt (Abb. 2.4). Dazu wurde jeweils der Proteinextrakt von *U. maydis*-Zellen, die GFP-markiertes Cdc42 exprimierten, mit GDP beziehungsweise mit nicht hydrolysierbarem GTP $\gamma$ S zwangsbeladen. So konnte überprüft werden, ob die inaktive oder aktive Variante der GTPase bevorzugt gebunden wird. Es konnte gezeigt werden, dass nur Hob3 mit der kleinen GTPase Cdc42, sowohl im inaktiven als auch im aktiven Zustand, interagiert. Dieses Ergebnis ist überraschend, da BAR-Domänen Proteine vermutlich dimerisieren müssen, um mit kleinen GTPasen interagieren zu können (Tarricone et al., 2001; Habermann, 2004). Im Präzipitations-Experiment konnte keine Homodimerisierung von Hob3 nachgewiesen werden, da Hob3-GFP bereits an die GSH-Agarose-Matrix gebunden hat. Aufgrund dieses Hintergrunds konnte keine Aussage über die Interaktion getroffen werden. Es ist aber wahrscheinlich, dass im Fall von Hob3 Homodimere gebildet werden, da zur Bindung einer Dimerisierung notwendig ist.

### 2.1.4 Eine Deletionsmutante von Hob3 zeigt einen verzögerte Zellteilung

Da Hob3 mit der BAR-Domäne von Hot1 dimerisiert, stellte sich die Frage, ob diese Proteine auch eine gemeinsame Funktion haben. Daher wurden Deletionsstämme von Hob1 und Hob3 hergestellt. Wie bereits erwähnt, wird in Wildtyp-Zellen von *U. maydis* die Tochterzelle von der Mutterzelle durch den Einzug von zwei Septen getrennt. Die Deletion von Hob1 führt zu keinem sichtbaren Phänotyp. Die Zellen zeigen eine ovale Zellform, bilden während der Zelltrennung beide Septen aus und trennen sich an der durch die beiden Septen eingeschlossene Fragmentierungszone (nicht gezeigt). Zellen, in denen *hob3* deletiert ist, bilden hingegen Zellaggregate von vier bis fünf Zellen (Abb. 2.5). Die Zellen knospen zunächst an einer Seite, doch bevor es zur Zellteilung kommt, beginnt die Tochterzelle bereits mit der Ausbildung einer Knospe. Gleichzeitig beginnt die Mutterzelle am gegenüberliegenden Pol ebenfalls damit eine neue Knospe zu bilden. Einige Zellen zeigten auch die Ausbildung einer zweiten Knospe am selben Zellpol. Allerdings ist die *hob3* Deletionsmutante dazu in der Lage beide Septen, die zur korrekten Zytokinese in *U. maydis* notwendig sind, auszubilden (nicht gezeigt). Dies deutet darauf hin, dass die *hob3* Deletionsmutante nicht komplett im Zelltrennungsprozess gestört ist, sondern dass die Zellteilung in diesen Zellen verzögert abläuft. Die Hefe-Homologe von Hob1 und Hob3, Rvs161 und Rvs167, spielen eine wichtige Rolle bei der frühen Endozytose. Um zu überprüfen, ob Hob1 und Hob3 in *U. maydis* einen Einfluss auf die Endozytose haben, wurden die Zellen der beiden Deletionsstämme mit dem Endozytosemarker FM4-64 gefärbt. Bei diesem Farbstoff handelt es sich um einen lipophilen Fluoreszenzmarker, der in die Zellmembran integriert und von dort über endozytotische Vesikel zur Vakuolenmembran transportiert wird (Vida and Emr, 1995). Kurz nach Zugabe des Farbstoffs wird zunächst intensiv die Zellmembran gefärbt. Dann wird FM4-64 durch Endozytose aufgenommen und ist an mobilen frühen Endosomen sichtbar. Schließlich wird FM4-64 durch die Fusion von späten Endosomen mit der Vakuole in die Vakuolenmembran integriert und färbt diese an. Die Zellen wurden zunächst in Wasser aufgenommen und mit FM4-64 gefärbt. Der nicht in die Zellwand integrierte Farbstoff wurde anschließend durch Waschen entfernt. Die Zellen wurden zusätzlich mit dem Fluoreszenzfarbstoff CMAC

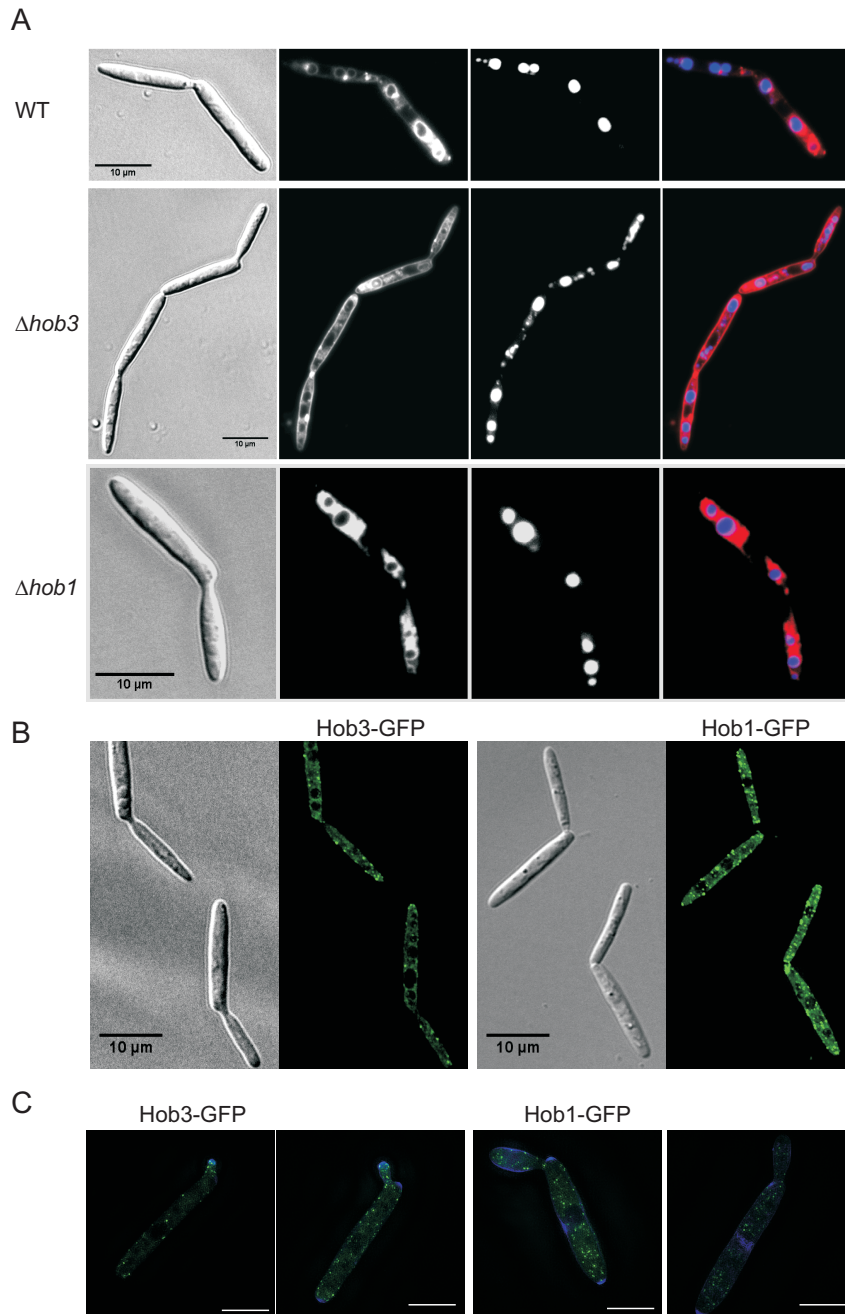


Abbildung 2.5: **Charakterisierung der BAR-Domänen Proteine Hob1 und Hob3.**

(A) Während die Deletion von *hob1* zu keinerlei morphologischen Defekten führt, zeigen Zellen, in denen *hob3* deletiert wurde einen leichten Zelltrennungsdefekt. Um zu überprüfen, ob die Deletionen der beiden Proteine einen Einfluss auf die Endozytose haben, wurden Wildtyp-Zellen und die Deletionsstämme mit dem Endozytosemarker FM4-64 und dem Vakuolenmarker CMAC gefärbt. Sowohl in Wildtyp-Zellen als auch  $\Delta hob1$  Zellen ist nach 60 Minuten die Vakuolenmembran von FM4-64 gefärbt und umgibt das mit CMAC angefärbte Vakuolenlumen.  $\Delta hob3$  Zellen zeigen hingegen eine frühe Blockade der endozytotischen Prozesse und nach 60 Minuten befindet sich FM4-46 noch immer an der Plasmamembran. (B) Um die intrazelluläre Lokalisation von Hob1 und Hob3 zu untersuchen wurden endogene C-terminale GFP-Fusionen der Proteine hergestellt. Sowohl Hob1 als auch Hob3 lokalisieren in Partikeln, die sich unter der Plasmamembran und im Zytoplasma befinden. Für eine bessere Detektion wurden die Bilder mit der Software Volocity dekonvolviert. (C) Um eine bessere Auflösung des GFP-Signals zu erhalten, wurden die Stämme zusätzlich mittels hochauflösender Mikroskopie an einem OMX V4 SIM-Mikroskop analysiert (in Zusammenarbeit mit Kay Schink). Dieses Mikroskop verdoppelt die Auflösung des Lichtmikroskops in allen 3 Dimensionen und erreicht damit eine Auflösung von 120 nm in XY und 300 nm in der Z-Richtung.

(CellTrackerTM blue) angefärbt. Dieser auf Cumarin basierende Farbstoff fluoresziert im sauren Milieu und macht auf diese Weise selektiv die Vakuolen sichtbar (Stewart and Deacon, 1995). Durch die doppelte Färbung konnte sowohl die Morphologie der Vakuolen als auch die Fusion der endozytotischen Vesikel an die Vakuolenmembran untersucht werden. In Wildtyp-Zellen und in  $\Delta hob1$  Zellen zeigten sich dabei keine Unterschiede. Die einzelnen Zellen enthalten zwei bis drei große Vakuolen, die durch CMAC angefärbt sind. In die Membran dieser Vakuolen ist FM4-64 nach 60 Minuten eingelagert worden, so dass die blau gefärbten Vakuolen von einem roten Ring umrandet sind (Abb. 2.5). Die Zellen der *hob3*-Deletionsmutante zeigten hingegen einen deutlichen Unterschied zu Wildtyp-Zellen. Zwar enthalten auch die  $\Delta hob3$ -Zellen zwei bis drei große Vakuolen, doch zeigten die Zellen, im Vergleich zum Wildtyp, eine deutlich verlangsamte Endozytose. Während in Wildtyp-Zellen innerhalb von 60 Minuten der FM4-64 Farbstoff nahezu komplett in die Vakuolenmembran transportiert wurde, ist in dieser Zeitspanne in den  $\Delta hob3$ -Zellen nur ein kleiner Teil des Farbstoffs zur Vakuolenmembran transportiert worden. Der größere Teil verbleibt an der Plasmamembran und im Zytoplasma (Abb. 2.5). Eventuell sind  $\Delta hob3$ -Mutanten in der Abschnürung endozytotischer Vesikel an der Zellmembran gestört. Um die intrazelluläre Lokalisation der beiden BAR-Domänen Proteine Hob1 und Hob3 in *U. maydis* zu untersuchen, wurden C-terminale GFP-Fusionen der beiden Proteine am endogenen Locus generiert. Sowohl Hob1 als auch Hob3 lokalisieren in Partikeln, die sich unter der Plasmamembran und im Zytoplasma befinden (Abb. 2.5). Bei diesen Partikeln könnte es sich um frühe endozytotische Vesikel handeln und der Lokalisation der homologen Proteine Rvs161 und Rvs167 aus Hefe entsprechen (Brizzio et al., 1998; Balguerie et al., 1999). Die Lokalisation von Hob3 würde gut mit den beobachteten Endozytosedefekten übereinstimmen.

Aufgrund der vielfältigen Funktionen von BAR-Domänen Proteinen ist es sehr schwierig, diese in einen einheitlichen zellulären Kontext einzuordnen. Allerdings scheint Hob3 einen Knotenpunkt zwischen Zellmorphologie und Endozytose darzustellen. Hob3 interagiert sowohl mit Hob1 als auch mit Hot1 und könnte somit eine Kernkomponente von verschiedenen Komplexen darstellen. Dies würde den im Vergleich zu den zwei anderen BAR-Proteinen relativ starken Phänotyp erklären.

## 2.2 Der RhoGEF Hot1 diskriminiert mittels eines neuen Spezifitätsmechanismus zwischen Cdc42 und Rac1

### 2.2.1 Isolierung von rekombinanten GTPasen und GEFs

Um die Funktion eines RhoGEFs näher zu charakterisieren und seine Funktion in zellulären Signalkaskaden zu bestimmen, ist es wichtig, die GTPase zu identifizieren, die von ihm aktiviert werden. Rho-GTPasen weisen eine hohe Sequenzähnlichkeit auf, haben aber verschiedene Funktionen innerhalb einer Zelle. Ein wichtiger Aspekt bei dem Verständnis der Signaltransduktion durch kleine GTPasen ist, dass in komplexen Signalkaskaden eine spezifische Signalweiterleitung gewährleistet werden muss und dass der richtige Signalweg aktiviert wird. In einer Zelle gibt es deutlich mehr Aktivatoren und Effektoren, als es GTPasen gibt. Darum ist es umso wichtiger, dass sichergestellt wird, dass kleine GTPasen sehr spezifisch erkannt werden, so dass

auf einen spezifischen Stimulus die richtige Signalantwort erfolgt. Um etwas über die Spezifität von RhoGEFs in *U. maydis* aussagen zu können, wurde ein biochemisches Testsystem verwendet. Dieses *in vitro* Testsystem erlaubt die Bestimmung der Aktivität und der Spezifität von RhoGEFs gegenüber kleinen GTPasen. In Abbildung 2.6 ist schematisch das Prinzip des verwendeten Testsystems dargestellt.

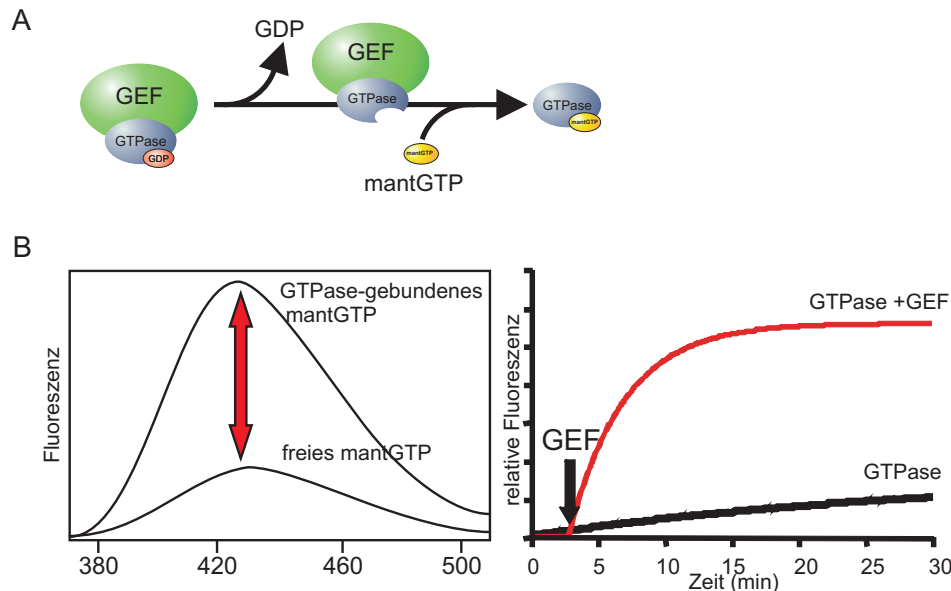


Abbildung 2.6: Schematische Darstellung eines *in vitro* GEF Assays.

(A) Die Spezifität eines RhoGEFs kann mit Hilfe eines *in vitro* GEF Assay bestimmt werden. In diesem Assay wird ein fluoreszierendes Analog von GTP benutzt, welches als mantGTP bezeichnet wird. Wird eine GTPase mit einem RhoGEF in Anwesenheit von mantGTP inkubiert, katalysiert der RhoGEF die Freisetzung des von der GTPase gebundenen GDPs. Da mantGTP im Überschuss vorliegt, bindet die nukleotidfreie GTPase bevorzugt dieses Nukleotid. (B) Freies mantGTP weist nur eine geringe Fluoreszenz auf. Die Fluoreszenz von mantGTP wird stark erhöht, wenn dieses Nukleotid an eine GTPase gebunden ist. Durch diese höhere Fluoreszenz kann der Austausch von GDP zu mantGTP direkt gemessen werden. Wird nun eine GTPase mit mantGTP inkubiert, aber es befindet sich in dieser Reaktion kein spezifischer RhoGEF, ist nur eine leichte Erhöhung der Fluoreszenz zu beobachten. Dies ist auf den basalen Nukleotid-Austausch der GTPase zurückzuführen. Wird ein spezifischer RhoGEF zu dieser Reaktion gegeben, ist ein deutlicher Anstieg der Fluoreszenz zu beobachten. Dieser Anstieg der Fluoreszenz kann fluorimetrisch gemessen werden.

Das System basiert auf einem fluorimetrischen Ansatz, bei dem der Austausch von GDP mit Hilfe des fluoreszierenden GTP-Analogs N-methylantraniloyl-GTP (mantGTP) gemessen werden kann (Neal et al., 1990). mantGTP hat eine geringe Fluoreszenz, wenn es sich in wässriger Lösung befindet. Bindet mantGTP allerdings an eine GTPase, zeigt sich eine deutlich höhere Fluoreszenz. Wenn eine GTPase alleine mit mantGTP inkubiert wird, ist nur eine leichte Erhöhung der Fluoreszenz zu beobachten. Dies ist auf den spontanen Nukleotid-Austausch der GTPase zurückzuführen und wird im folgenden als "Basalaktivität" bezeichnet. Wird nun aber ein spezifischer RhoGEF zu dieser Reaktion hinzugefügt, ist ein rasanter Anstieg der Fluoreszenz durch den RhoGEF-katalysierten Nukleotid-Austausch zu beobachten. Dieser Anstieg der Fluoreszenz kann fluorimetrisch verfolgt werden, um den RhoGEF-katalysierten Nukleotid-

Austausch zu messen.

Um die Spezifität von Hot1 zu untersuchen, wurden die katalytische DH-Domäne von Hot1 sowie die kleine GTPase Cdc42 als GST-Fusionsproteine in *E. coli* überexprimiert und mit Hilfe einer Affinitätschromatographie gereinigt. Neben Cdc42 wurde auch die eng verwandte GTPase Rac1 analysiert. Ebenfalls wurden zwei Punktmutanten von Cdc42 und Rac1 untersucht, Cdc42<sup>F56W</sup> und Rac1<sup>W56F</sup>. In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass diese Aminosäure ein wichtiger Faktor für die Diskriminierung zwischen Cdc42 und Rac1 durch RhoGEFs der Dbl-Familie ist (Gao et al., 2001; Karnoub et al., 2001).

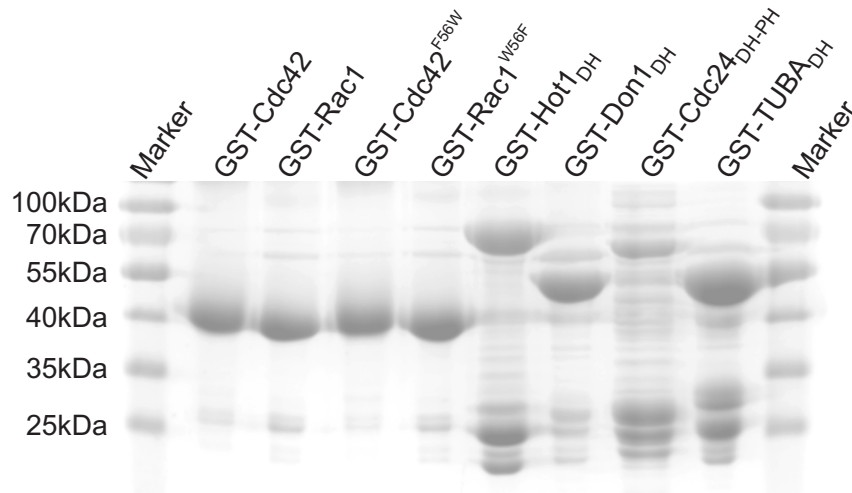


Abbildung 2.7: **Aufreinigung von kleinen GTPasen und Dbl-Proteinen aus *E. coli*.**

Es wurden Cdc42 (48kDa), Rac1 (48kDa), Cdc42<sup>F56W</sup> (48kDa) und Rac1<sup>W56F</sup> (48kDa), sowie die katalytische DH-Domäne von Don1 (58kDa), Hot1 (75kDa) und TUBA (54kDa) und die DH-PH-Domäne von Cdc24 (78kDa) als GST-Fusionsproteine in *E. coli* produziert und mit Hilfe einer GST-Affinitäts-Chromatographie aufgereinigt. Die gereinigten Proteine wurden mittels SDS-Page aufgetrennt und das Gel mit Coomassie-Brilliantblau gefärbt. Die GTPasen sowie die DH-Domänen konnten in hoher Reinheit isoliert werden. Die DH-Domänen von Hot1, TUBA und Cdc24 zeigten hingegen einige unspezifische Banden und Abbaubanden auf.

Abbildung 2.7 zeigt exemplarisch ein SDS-Gel, welches mit Coomassie Brilliantblau gefärbt wurde. Gezeigt sind die gereinigten GTPasen Cdc42, Rac1, Cdc42<sup>F56W</sup> und Rac1<sup>W56F</sup> sowie die katalytische DH-Domäne von Hot1 und von humanem TUBA, die DH-Domäne von Don1 und die DH-PH Domäne von Cdc24. Es wurden für die *in vitro* Versuche nur die katalytischen Domänen der einzelnen RhoGEFs verwendet, da die Vollängen-Proteine nicht in löslicher Form hergestellt werden konnten. Die Proteine wurden als GST-Fusionproteine gereinigt und auch in dieser Form in den *in vitro* GEF-Assay eingesetzt.

## 2.2.2 Hot1 ist ein Cdc42- und Rac1- spezifischer GEF

Um zu untersuchen, welche Austauschspezifität Hot1 besitzt, wurde ein *in vitro* GEF-Assay mit den beiden GTPasen Cdc42 und Rac1 und der katalytischen DH-Domäne von Hot1 durchgeführt. Als Nukleotid in diesem Experiment dient mant-GDP (N-methylantranoyl-GDP). Im GEF-Assay können sowohl mant-GTP als auch mant-GDP benutzt werden, denn es wird nicht die GTPase Aktivität untersucht, sondern die Nukleotid-Austauschaktivität des RhoGEFs.

Durch Bindung des RhoGEFs an die GTPase wird die Nukleotidbindetasche geöffnet, indem eine Umordnung der Switch-Regionen ausgelöst wird (siehe Einleitung). Die Bindung des Nukleotids in die vom RhoGEF geöffnete Bindetasche ist unabhängig vom Phosphorylierungsgrad des angebotenen Nukleotids.

Um den Hot1-katalysierten Nukleotid-Austausch *in vitro* zu messen, wurden die gereinigten GTPasen in einer definierten Menge zusammen mit dem Nukleotidanalogue mantGDP in GEF-Assay-Puffer inkubiert. Nach einer fünf-minütigen Equilibrierungsphase wurde eine definierte Menge der DH-Domäne von Hot1 zur Reaktion hinzugefügt. In der Kontrollreaktion wurde das entsprechende Volumen Puffer zugegeben. Die Inkorporation von mantGDP wurde anschließend für 60 Minuten fluorimetrisch verfolgt. In Abbildung 2.8 sind die Ergebnisse dieses GEF-Assays dargestellt. Es zeigt sich, dass Hot1 in der Lage ist, sehr effektiv den Nukleotid-Austausch an der GTPase Cdc42 zu katalysieren. Allerdings kann Hot1 auch im geringen Maße Rac1 aktivieren. Der leichte Anstieg der Fluoreszenz, der auch in der Kontrollreaktion zu beobachten ist, ist auf die spontane Freisetzung des gebundenen Nukleotids und die Bindung von mantGDP durch die nukleotidfrei Form der GTPase zurückzuführen.

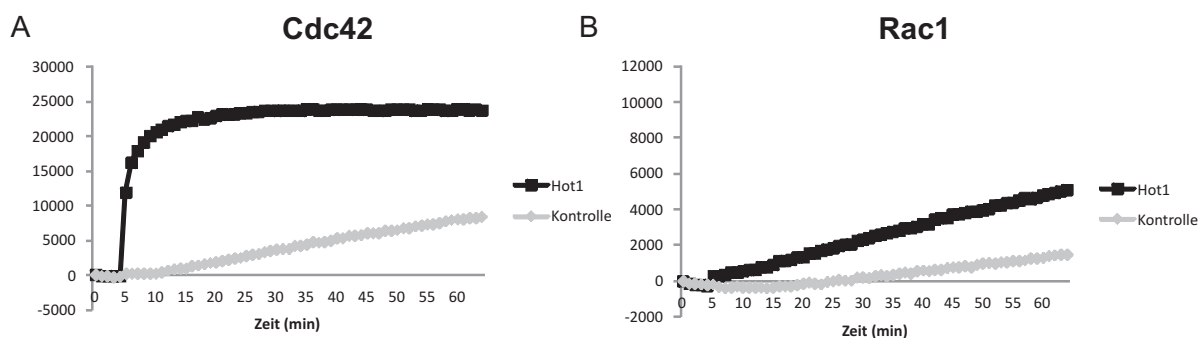


Abbildung 2.8: *In vitro* GEF-Aktivität von Hot1.

In einem *in vitro* GEF-Assay wurde die katalytische DH-Domäne des RhoGEFs Hot1 auf ihre Fähigkeit hin untersucht, den Nukleotid-Austausch an den kleinen GTPasen Cdc42 und Rac1 zu katalysieren. Während Hot1 eine sehr starke Nukleotid-Austausch-Aktivität gegenüber Cdc42 aufweist, kann Rac1 nur sehr schwach von Hot1 aktiviert werden.

Die GEF-Assays wurden jeweils mit einer Endkonzentration von 1  $\mu$ M GST-Hot1-DH, GST-Cdc42 und GST-Rac1 durchgeführt. Auf der y-Achse ist die relative Fluoreszenz aufgetragen.

### 2.2.3 Die Aminosäure an Position 56 in Cdc42 und Rac1 hat keinen Einfluss auf die GTPase-Spezifität von Hot1

Die beiden GTPasen Cdc42 und Rac1 weisen eine sehr hohe Sequenzähnlichkeit auf (vergleiche Abb. 2.10). Dennoch haben beide GTPasen ganz unterschiedliche Funktionen in der Zelle. Deletionsmutanten von Cdc42 und Rac1 zeigen sehr verschiedene Phänotypen. Dies lässt auf eine Beteiligung an unterschiedlichen Signalkaskaden schließen. Allerdings teilen Cdc42 und Rac1 sich mindestens essentielle Funktion, da eine Doppelmutante letal ist (Mahlert et al., 2006). Eine wichtige Frage innerhalb komplexer Signal-Netzwerke ist, wie RhoGEFs zwischen nah verwandten GTPasen unterscheiden können. Es konnte gezeigt werden, dass eine konser-



vierte Aminosäure an Position 56 der GTPase wichtig ist für die Unterscheidung von Cdc42 und Rac1 durch viele RhoGEFs (Gao et al., 2001; Karnoub et al., 2001). Diese Aminosäure ist in Cdc42-Proteinen ein Phenylalanin und in Rac1-Proteinen ein Tryptophan. Auch in *U. maydis* ist diese Aminosäure wichtig für die Unterscheidung zwischen Cdc42 und Rac1 durch bereits charakterisierten RhoGEFs (Hlubek et al., 2008; Schink, 2010; Hlubek, 2008).

Um zu überprüfen, wie sich ein Austausch dieser Aminosäuren an Position 56 auf die Spezifität von Hot1 auswirkt, wurden die Effekte der entsprechenden Protein-Varitanten in einem *in vitro* GEF-Assay mit Hot1 getestet. Als Kontrolle dienten die beiden bereits gut charakterisierten RhoGEFs Don1 und Cdc24. Von Cdc24 wurde das DH-PH Tandem-Motiv benutzt, da die DH-Domäne alleine nicht katalytisch aktiv ist. Wie in Abbildung 2.9 A dargestellt, katalysiert Don1 sehr spezifisch den Nukleotid-Austausch an Cdc42, während keinerlei Aktivierung von Rac1 zu beobachten ist. Im Vergleich zu den Wildtyp GTPase zeigen Punktmutanten, Cdc42<sup>F56W</sup> und Rac1<sup>W56F</sup>, ein verändertes Verhalten gegenüber Don1. Während Cdc42 sehr effizient durch Don1 aktiviert werden kann, zeigt die Punktmutante Cdc42<sup>F56W</sup> eine deutlich reduzierte Aktivierung durch Don1. Im Vergleich dazu verhält sich die Punktmutante von Rac1 entgegengesetzt. Während Rac1 nicht von Don1 aktiviert werden kann, führt der Austausch der Aminosäure 56 von einem Tryptophan zu einem Phenylalanin dazu, dass die GTPase sehr gut durch Don1 aktiviert werden kann.

Auch für den RhoGEF Cdc24 wurde ein Wechsel der Spezifität beobachtet. Abbildung 2.9 B zeigt, dass Cdc24 sowohl Rac1 als auch Cdc42 aktivieren kann. Cdc42 kann von Cdc24 nur sehr schwach aktiviert werden, wohingegen Cdc24 den Nukleotid-Austausch an Rac1 sehr effizient katalysieren kann. Der Austausch der Aminosäure 56 hat zur Folge, dass Rac1<sup>W56F</sup> im Vergleich zu Wildtyp-Rac1 nur sehr schwach aktiviert werden kann. Die korrespondierende GTPase Cdc42<sup>F56W</sup> wird allerdings sehr effektiv aktiviert.

Da Hot1 ebenfalls sehr effizient den Nukleotid-Austausch an Cdc42 katalysieren kann, wurde getestet, ob die Aminosäure 56 auch für die Spezifität von Hot1 kritisch ist. Wie in Abbildung 2.9 zu sehen ist, hat der Austausch der Aminosäure 56 zwischen Cdc42 und Rac1 keinen Einfluss auf die Spezifität von Hot1. Die Punktmutante von Cdc42, Cdc42<sup>F56W</sup>, kann ebenso effektiv von Hot1 aktiviert werden, wie die Wildtyp-Variante. Auch das Einbringen von Phenylalanin an Position 56 in Rac1 hat keinen Effekt auf die Aktivierung durch Hot1. Dies bedeutet, dass der RhoGEF Hot1 anscheinend einen anderen Spezifitätsmechanismus benutzt, um zwischen den beiden GTPasen Cdc42 und Rac1 zu unterscheiden.

### 2.2.4 Bestimmung der spezifitätsbestimmenden Region von Cdc42 für den GEF Hot1

Bisher wurde die Aminosäure an Position 56 in Cdc42 und Rac1 als kritischer Faktor für die Diskriminierung zwischen Cdc42 und Rac1 durch RhoGEFs der Dbp-Familie beschrieben (Gao et al., 2001; Karnoub et al., 2001). Um die Aminosäure beziehungsweise die Region von Cdc42 zu identifizieren, die für die Spezifitätsbestimmung von Hot1 wichtig ist, wurden verschiedene chimäre Proteine aus Cdc42 und Rac1 generiert. Dazu wurden die beiden GTPasen zunächst in annähernd gleich große Bereiche eingeteilt (vergleiche Abbildung 2.10). Die einzelnen Module



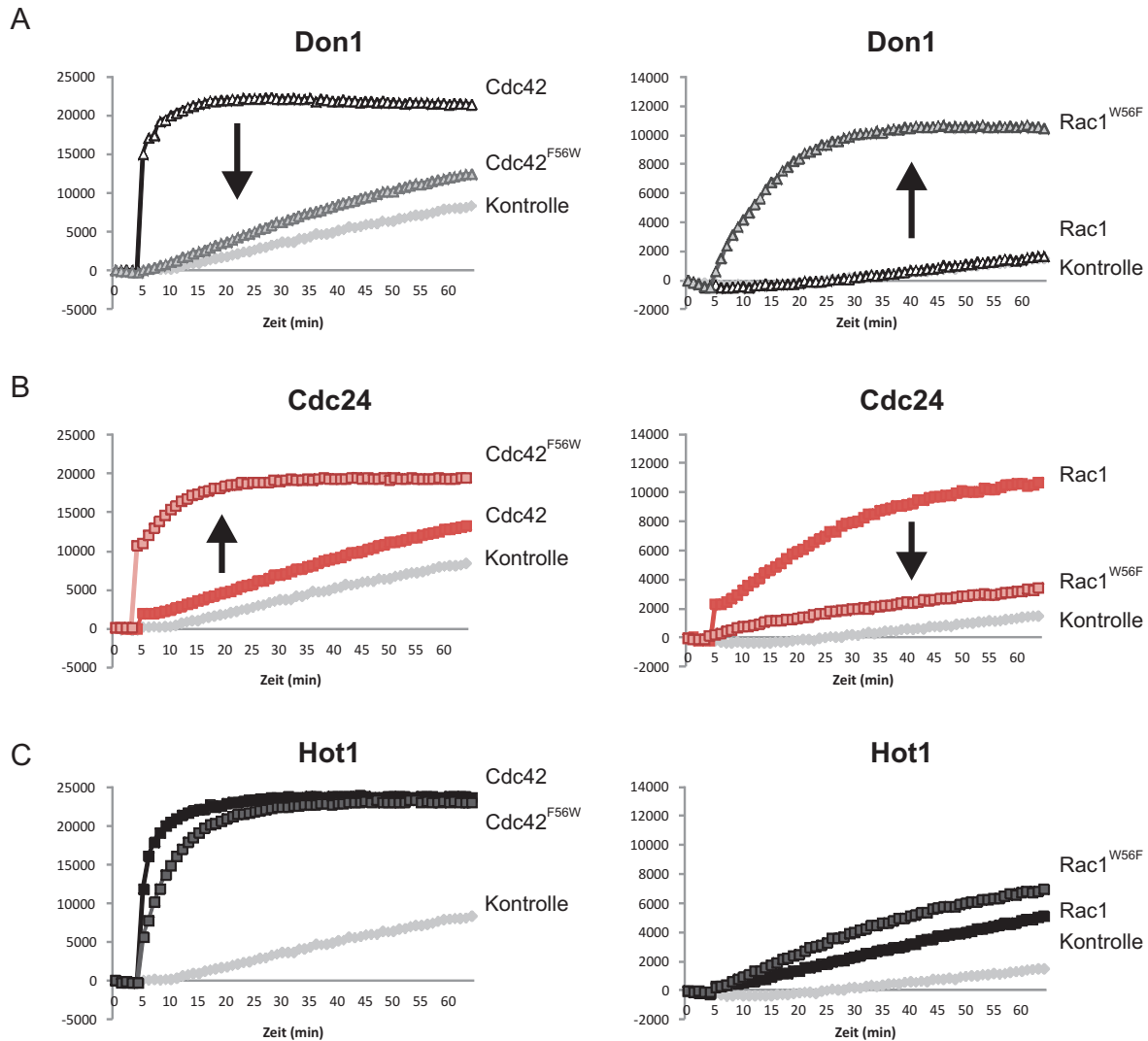


Abbildung 2.9: Die Aminosäure an Position 56 in Cdc42 hat keinen Einfluss auf die Spezifitätsdetermination von Hot1.

(A) Die katalytische DH-Domäne von Don1 zeigt eine starke Nukleotid-Austausch-Aktivität gegenüber Cdc42, während Rac1 nicht von Don1 aktiviert werden kann. Allerdings reicht der Austausch der Aminosäure an Position 56 in Rac1 von einem Trp zu einem Phe aus, um eine Aktivierung durch Don1 zu ermöglichen. Der Austausch von Aminosäure 56 in Cdc42 zu einem Trp führt dagegen zu einer reduzierten Aktivierung durch Don1. (B) Das DH-PH-Motiv von Cdc24 ist hingegen in der Lage den Nukleotid-Austausch an Rac1 sehr effizient zu katalysieren, während im Vergleich dazu die kleine GTPase Cdc42 nur sehr schwach aktiviert werden kann. Auch hier genügt der Austausch der Aminosäure 56 zwischen Cdc42 und Rac1, um einen Wechsel der Spezifitäten zu bewirken. Der Austausch von Trp zu Phe in Rac1 führt zu einem beinahe vollständigen Verlust der Aktivierbarkeit durch Cdc24. Während der Austausch dieser Aminosäure in Cdc42 dazu führt, dass die Mutante Cdc42<sup>F56W</sup> deutlich besser von Cdc24 aktiviert werden kann. (C) Der Austausch von Aminosäure 56 zwischen Cdc42 und Rac1 hat allerdings keinen Einfluss auf die Aktivierbarkeit der beiden kleinen GTPasen durch den RhoGEF Hot1.

Die GEF-Assays wurden jeweils mit einer Endkonzentration von 1  $\mu$ M GST-Hot1-DH, GST-Don1, GST-Cdc24-DH-PH, GST-Cdc42, GST-Cdc42<sup>F56W</sup>, GST-Rac1 und GST-Rac1<sup>W56F</sup> durchgeführt. Auf der y-Achse ist die relative Fluoreszenz aufgetragen.

wurden mit Primern amplifiziert, die an den Fragmentgrenzen 30 Nukleotide Überhang zum angrenzenden Fragment der korrespondierenden GTPase aufwiesen. Die einzelnen Fragmente wurden dann mit den korrespondierenden Fragmenten, die für die entsprechenden Bereiche des jeweils anderen Proteins codieren, in Hefe transformiert. Dort wurden die Fragmente vom Rekombinationssystem der Hefe über homologe Rekombination verknüpft (siehe "Drag and Drop", Material und Methoden). Die Fragmentgrenzen lagen in Regionen mit hoher Homologie, so dass die Struktur der Proteine durch die Fusion so gering wie möglich beeinträchtigt wurde. Dadurch gelang es, chimäre Proteine zu konstruieren, in denen zunehmend größere N-terminale Fragmente von Cdc42 mit entsprechenden C-terminalen Bereichen von Rac1 kombiniert sind. Ebenso wurden die korrespondierenden chimären GTPasen mit N-terminalen Fragmenten von Rac1 und C-terminalen Bereichen von Cdc42 konstruiert (vergleiche Abbildung 2.10). Die Fragmentgrenzen lagen bei Aminosäure 35, 45, 50, 70, 118 und 157. Weiterhin wurden chimäre GTPasen generiert, in denen die interne Region im Bereich von Aminosäure 35 und 70 zwischen Cdc42 und Rac1 ausgetauscht wurde. Diese interne Region liegt genau in dem Bereich zwischen den beiden SwitchI und SwitchII Regionen und umfasst die antiparallelen  $\beta$ -Faltblätter  $\beta 2$  und  $\beta 3$  der GTPasen. Diese ausgetauschte Region deckt sich mit der sogenannten Effektorbindeschleife, die als Interaktionsfläche für Effektoren und auch RhoGEFs dient (Gu et al., 2004; Maesaki et al., 1999). Außerdem befindet sich in dieser Region die spezifitätsbestimmende Aminosäure an Position 56. Darüber hinaus wurden chimäre GTPasen konstruiert, in denen diese interne Region nochmal aufgeteilt wurde. In diesen chimären Konstrukten wurden die Fragmente zwischen Aminosäure 35 und 45 sowie Aminosäure 45 und 70 zwischen den beiden GTPasen ausgetauscht. Die verschiedenen GTPasen wurden N-terminal an GST fusioniert, in *E.coli* überexprimiert und mittels Affinitäts-Chromatographie gereinigt. In einem *in vitro* GEF-Assay wurde untersucht, ob diese verschiedenen chimären GTPasen von Hot1 aktiviert werden können. Als Kontrolle in diesen Experimenten diente der Cdc42-spezifische RhoGEF Don1 und der Rac1-spezifische RhoGEF Cdc24.

In Abbildung 2.10 ist die Zusammenfassung der Ergebnisse der verschiedenen GEF-Assays gezeigt. Um die verschiedenen *in vitro* GEF-Assays mit einander vergleichen zu können, wurden jeweils gleiche Mengen der GTPase mit den verschiedenen RhoGEFs inkubiert. Zudem war es erforderlich, einheitliche Bewertungskriterien für die einzelnen Experimente einzuhalten. Die Aktivierungen einer GTPasen wurden folgendermaßen bewertet: Als sehr gute Aktivierung (+++) einer GTPase durch einen RhoGEF wurden Reaktionen bezeichnet, in denen die Steigung der Fluoreszenzkurve nach Zugabe des jeweiligen RhoGEFs sehr schnell anstieg und die Kurve während der 60 minütigen Inkorporation mit mantGDP in eine Sättigung überging. Als gute Aktivierung (++) einer GTPase wurde eine Reaktion bezeichnet, die einen schwächeren, aber immer noch deutlichen Anstieg der Steigung nach Zugabe des jeweiligen RhoGEFs zur Folge hatte und auch in die Sättigung überging. Als schwach aktiviert (+) wurden Reaktionen bezeichnet, die nach Zugabe des RhoGEFs nur einen leichten Anstieg der Fluoreszenz zeigten und während der Reaktionszeit nicht in eine Sättigung überging. Besonders bei den chimären GTPasen, die aus dem N-terminalen Bereich von Rac1 und den restlichen Aminosäuren von Cdc42 (R35C, R45C und R50C) bestehen, war es teilweise sehr schwierig, eine Aktivierung der GTPase zu messen. Diese chimären GTPasen zeigten eine sehr hohe Basalaktivität. Dies könnte auf eine eventuell

nicht korrekte Faltung des Proteins zurückzuführen sein, wodurch die Affinität zum gebundenen Nukleotid geschwächt wird.

In Abbildung 2.11 sind die wichtigsten GEF-Assays zur Bestimmung der spezifitätsbestimmenden Region von Cdc42 für Hot1 aufgeführt. Während Rac1 (+) nur sehr schwach von Hot1 aktiviert werden kann, zeigt Abbildung 2.11 (B) einen GEF-Assay mit chimären GTPasen aus Cdc42 und Rac1, in denen die erste 45 Aminosäuren der jeweiligen GTPasen mit denen der korrespondierenden GTPase ausgetauscht wurden. Dieser Austausch der ersten 45 Aminosäuren von Rac1 gegen die ersten 45 Aminosäuren von Cdc42 ist ausreichend, dass die chimäre GTPase C45R von Hot1 gut (++) aktiviert werden kann. Auch Cdc24 kann C45R aktivieren, während Don1 dazu nicht in der Lage ist. Im Fall von Cdc24 entspricht dies den Resultaten aus früheren Experimenten, da diese chimäre GTPase die für Cdc24 spezifitätsbestimmende Aminosäure Trp(56) aus Rac1 enthält. Im Vergleich dazu kann die komplementäre GTPase R45C von Don1 aktiviert werden, aber nur sehr schlecht von Hot1 und Cdc24. Auch dieses Ergebnis von Don1 stimmt mit den vorherigen Resultaten überein, denn R45C enthält das Phenylalanin aus Cdc42 an Position 56, die für die Erkennung von Don1 wichtig ist. Es ist allerdings sehr schwer, eine Aussage über die Aktivierbarkeit dieser chimären GTPase R45C zu treffen, da die Basalaktivität dieses Fusionsproteins sehr hoch ist. Bei Don1 kann von einer Aktivierung gesprochen werden, da die Steigung der Kinetikkurve nach Zugabe von Don1 deutlich steiler wird. Bei Hot1 und bei Cdc24 ist dies schwieriger zu beurteilen, da sich die Fluoreszenzkurve nach Zugabe der jeweiligen RhoGEFs nur parallel verschiebt, sich aber die Steigung der Kurve nicht verändert (vergleiche Abb. 2.11). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die ersten 45 Aminosäuren von Cdc42 ausreichend sind, um von Hot1 erkannt zu werden.

Zunehmende N-terminale Fragmentgrößen von Cdc42 (C50R, C70R) hatten keinen verstärkenden Einfluss auf die Aktivierung durch Hot1 (siehe Übersicht 2.10). Erst die chimäre GTPase C118R, die aus den ersten 118 Aminosäure von Cdc42 und den restlichen von Rac1 besteht, zeigte eine ähnlich starke Aktivierung wie die Wildtyp-Variante von Cdc42 (+++) (siehe Übersicht 2.10). Dies deutet darauf hin, dass der Bereich zwischen Aminosäure 70 und 118 in Cdc42 anscheinend auch einen Einfluss auf die Aktivierung durch Hot1 hat.

Mit Hilfe einer weiteren chimären GTPase wurde untersucht, in wie weit der C-terminale Bereich von Cdc42 einen Einfluss auf die Spezifität von Hot1 hat. Zu diesem Zweck wurde der C-terminale Bereich nach der Effektor-domäne der chimären GTPase C45R gegen den von Cdc42 ausgetauscht, so dass eine GTPase aus den ersten 45 Aminosäuren von Cdc42, den mittleren 45 bis 70 Aminosäuren aus Rac1 und den restlichen 122 Aminosäuren von Cdc42 (C45R70C) entsteht. Ebenfalls wurde die entsprechend korrespondierende GTPase R45C70R generiert. Abbildung 2.11 (C) zeigt, dass sowohl Hot1 als auch Cdc24 die chimäre GTPase C45R70C sehr viel effektiver aktivieren können (+++), als die ursprüngliche GTPase C45R (++). Im Vergleich hierzu kann die korrespondierende GTPase R45C70R sehr gut von Don1, aber gar nicht von Hot1 oder Cdc24 aktiviert werden. Um zu überprüfen, ob der C-terminale Bereich von Cdc42 zwingend für die Aktivierung durch Hot1 benötigt, oder ob die Aktivierung lediglich verbessert wird, wurde eine chimäre GTPase getestet, die sich nur im C-terminalen Bereich ab Aminosäure 70 zwischen den GTPasen unterscheidet. Doch wie in Abbildung 2.11 (D) dargestellt, kann die chimäre GTPase R70C nicht von Hot1 und auch nicht von Don1, sondern ausschließlich durch

## 2 Ergebnisse

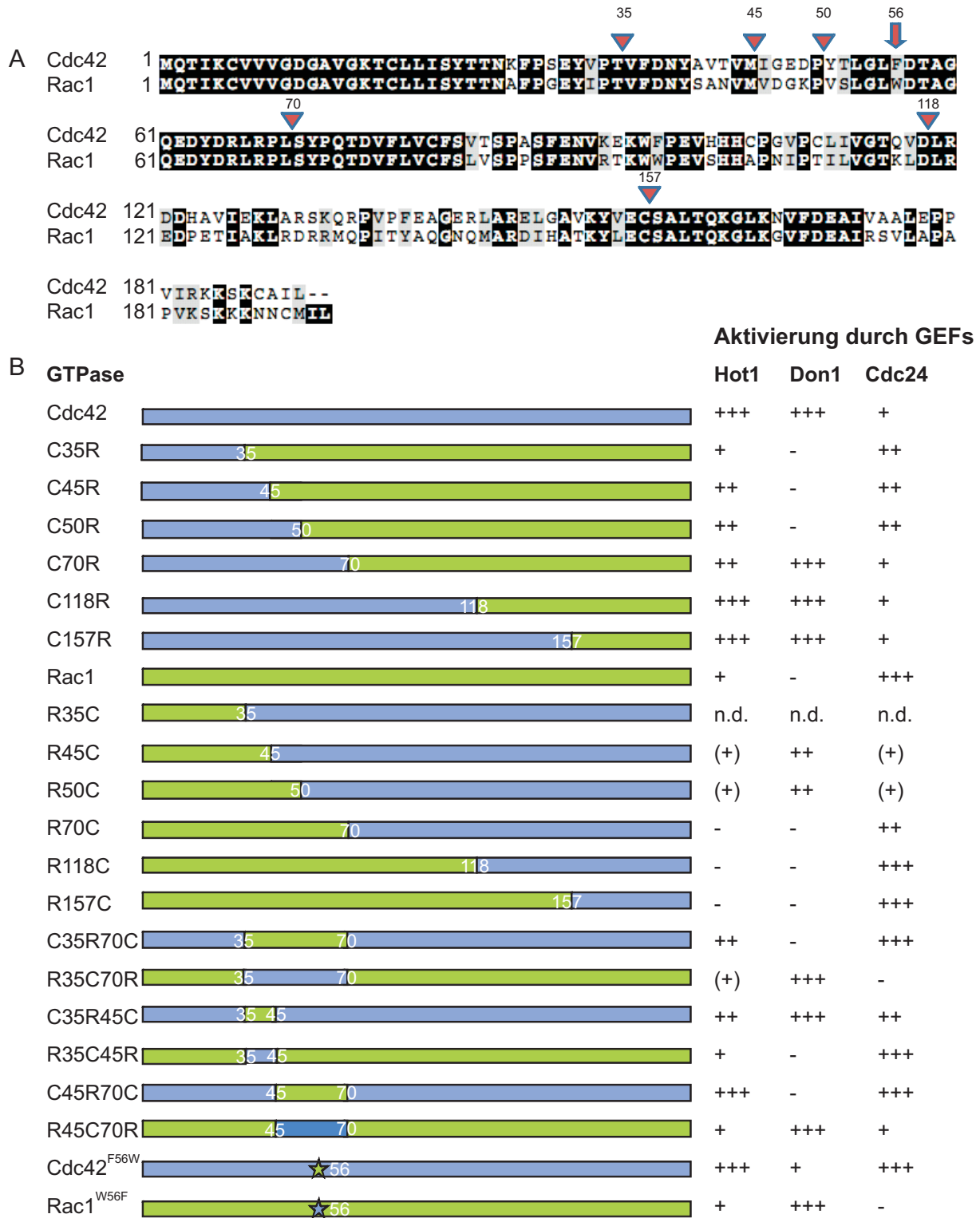


Abbildung 2.10: Eingrenzung der spezifitätsbestimmenden Region von Cdc42 für den Rho-GEF Hot1.

(A) Sequenzvergleich von Cdc42 und Rac1 aus *U. maydis*. (B) Darstellung der verschiedenen chimären Fusionsproteine. Um die spezifitätsbestimmende Region von Cdc42 für Hot1 einzugrenzen wurden chimäre Fusionsproteine von Cdc42 und Rac1 hergestellt. Diese wurden als GST-Fusionsproteine in *E. coli* überexprimiert, über Affinitätschromatographie aufgereinigt und in einem *in vitro* GEF-Assay auf Aktivierbarkeit durch Hot1 getestet. Als zusätzliche Kontrolle wurden die chimären GTPasen ebenfalls auf Aktivierbarkeit durch Don1 und Cdc24 getestet.

+++ = sehr gute Aktivierung, ++ = gute Aktivierung, + = schlechte Aktivierung, - = keinen Aktivierung, n.d. = nicht auswertbar

## 2 Ergebnisse

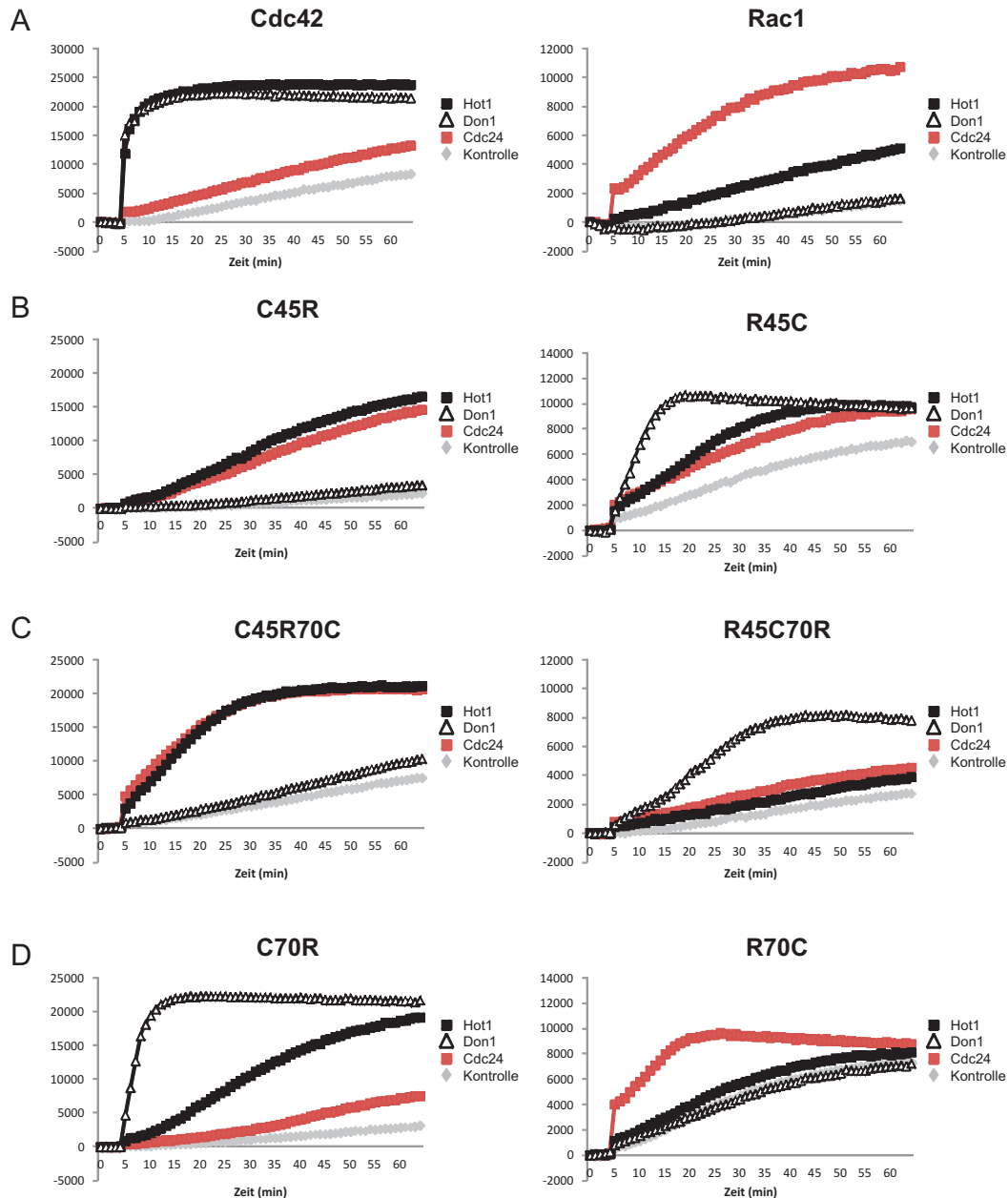


Abbildung 2.11: *In vitro* GEF-Aktivität von Hot1, Cdc24 und Don1 gegenüber chimären GTPases.

Dargestellt sind exemplarisch die aussagekräftigsten GEF-Assays der verschiedenen chimären GTPasen mit Hot1, Cdc24 und Don1. (A) Aktivierung der Wildtyp GTPasen durch die verschiedenen RhoGEFs. (B) Die chimäre GTPase C45R kann sowohl von Hot1 als auch von Cdc24 aktiviert werden, nicht aber von Don1. Don1 zeigt hingegen eine relativ gute Austauschaktivität gegenüber der komplementären GTPase R45C, während Hot1 und Cdc24 diese nur sehr schwach aktivieren können. (C) Sowohl Hot1 als auch Cdc24 können sehr effizient den Nukleotid-Austausch an der chimären GTPase C45R70C katalysieren, während die komplementäre GTPase R45C70R wiederum von Don1 aktiviert werden kann. (D) Die chimäre GTPase C70R kann sehr effektiv von Don1 aktiviert werden. Auch Hot1 zeigt eine gute Austauschaktivität gegenüber dieser chimären GTPase, nicht aber Cdc24. Im Gegensatz dazu ist Cdc24 in der Lage, den Nukleotid-Austausch an der komplementären GTPase R70C zu katalysieren, während Hot1 und Don1 keine Austauschaktivität zeigen.

Die GEF-Assays wurden jeweils mit einer Endkonzentration von 1  $\mu$ M GST-Hot1-DH, GST-Don1, GST-Cdc24-DH-PH, GST-Cdc42, GST-Rac1, GST-C45R, GST-R45C, GST-C45R70C, GST-R45C70R, GST-C70R und GST-R70C durchgeführt. Auf der y-Achse ist die relative Fluoreszenz aufgetragen.

Cdc24 aktiviert werden kann, während die korrespondierende GTPase C70R von Hot1 und Don1 aktiviert wird.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die ersten 45 Aminosäuren von Cdc42 ausreichend sind, um Cdc42 durch Hot1 zu aktivieren. Der C-terminale Teil von Cdc42 ist dagegen für die Aktivierung durch Hot1 nicht notwendig, erhöht aber die Aktivierbarkeit durch Hot1. Interessanterweise sind in diesem Bereich nur 6 Aminosäuren zwischen Cdc42 und Rac1 unterschiedlich. Diese wurden ebenfalls zwischen Cdc42 und Rac1 ausgetauscht und in einem *in vitro* GEF-Assay auf die Aktivierbarkeit durch Hot1 getestet. Allerdings hatte der Austausch einzelner Aminosäuren keinen Einfluss auf die Spezifität von Hot1 (Daten nicht gezeigt).

Um zu untersuchen, ob die chimären GTPasen C45R und C45R70C nicht nur *in vitro*, sondern auch *in vivo* durch Hot1 aktiviert werden können, wurde mit Hilfe eines CRIB-Präzipitation-Experiment versucht, die *in vivo* Aktivierung der verschiedenen GTPasen durch Hot1 nachzuweisen. Durch eine CRIB-Präzipitation ist es möglich, die Menge an aktiver GTPase in einer Zelle zu bestimmen.

Zur Präzipitation der aktiven GTPase wurde die CRIB-Domäne der Kinase Smu1, das Ste20-Homologs aus *U. maydis*, genutzt. Diese bindet selektiv nur die aktive Form der GTPasen Cdc42 und Rac1 (Leveleki et al., 2004). Für dieses Experiment wurde ein Stamm generiert, in dem der Leserahmen von *hot1* unter der Kontrolle des Arabinose-induzierbaren *crg*-Promotors steht. In diesem Stamm wurden jeweils die GTPasen Cdc42, Rac1, die Punktmutanten Cdc42<sup>F56W</sup> und Rac1<sup>W56F</sup> beziehungsweise die chimären GTPasen C45R, R45C, C45R70C und R45C70R als N-terminale GFP-Fusionsproteine ektopisch, unter Kontrolle des konstitutiv-aktiven *etef*-Promotors, in den *ip*-Lokus integriert. Die Zellen wurden unter nicht-induzierenden (Aus) und induzierenden (An) Bedingungen angezogen. Die Inkubation der Zellen unter induzierenden Bedingungen betrug drei Stunden. Anschließend wurden die Zellen geerntet und ein Proteinextrakt hergestellt. Für das CRIB-Präzipitationsexperiment wurde die CRIB-Domäne von Ste20 als GST-Fusionsprotein in *E. coli* überexprimiert und über Affinitäts-Chromatographie aufgereinigt. Gleiche Anteile der GST-CRIB-Domäne wurden mit gleichen Mengen an Proteinextrakten der verschiedenen Stämme inkubiert. Die Komplexe wurden mit Hilfe von GSH-Agarose präzipitiert, mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und auf eine PVDF Membran transferiert. Die GFP-markierten GTPasen wurden durch einen monoklonalen anti-GFP-Antikörper nachgewiesen. Es fiel auf, dass im Falle einer Aktivierung einer GTPase durch Hot1 deren Proteinlevel stark abnahm. Daher wurden parallel zu den CRIB-Präzipitationen auch ein Gesamtproteinextrakt analysiert und die Messwerte für die aktive GTPase gegen die Gesamtmenge der vorhandenen GTPase normalisiert. Nach dieser Normalisierung ist zu sehen, dass Hot1 auch *in vivo* dazu in der Lage ist, die GTPase Cdc42, die Punktmutante Cdc42<sup>F56W</sup>, aber auch die chimären GTPasen C45R und C45R70C zu aktivieren (siehe Abbildung 2.12, B). Diese Ergebnisse untermauern die *in vitro* gemessenen Daten.

Da der *in vitro* GEF-Assay mit den beiden GTPasen Cdc42 und Rac1 und der katalytischen DH-Domäne von Hot1 zeigt, dass Hot1 auch die kleine GTPase Rac1 in geringem Maß aktivieren kann (vergleiche Abb. 2.8), stellte sich die Frage, welche Region aus Rac1 für die Erkennung durch Hot1 wichtig ist. Durch die Generierung der verschiedenen chimären GTPasen aus Cdc42 und Rac1 konnte eine chimäre GTPase (R157C) identifiziert werden, die aus den ersten 157

## 2 Ergebnisse

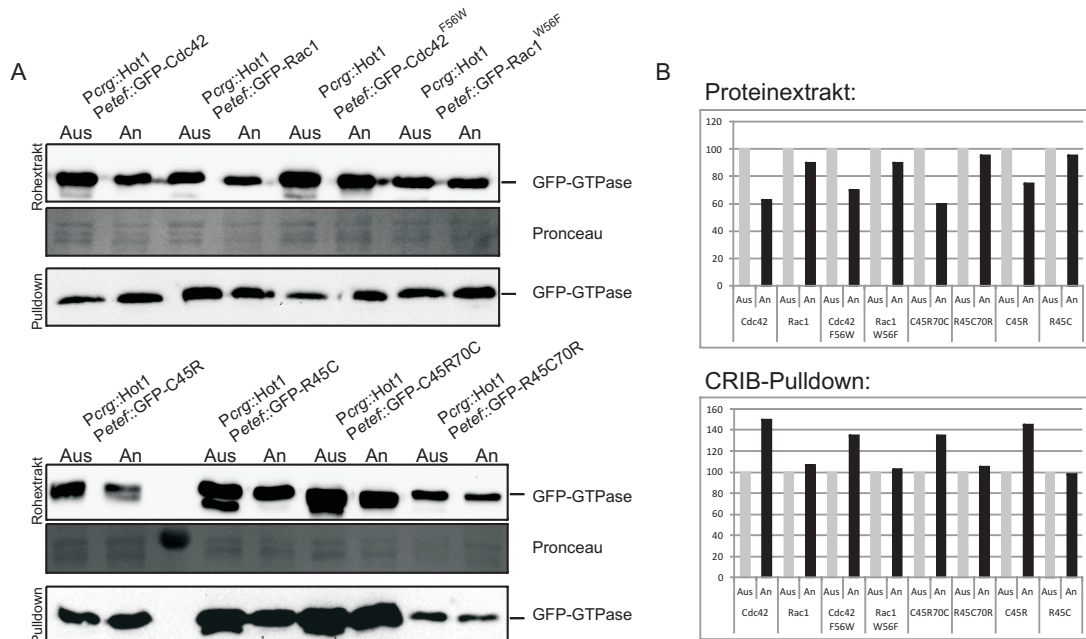


Abbildung 2.12: **Hot1 aktiviert die chimären GTPasen C45R und C45R70C *in vivo*.**

(A) Mit Hilfe eines CRIB-Präzipitation-Experiment wurde die Menge an aktiver GTPase in der Zelle gemessen. Es wurde ein Stamm erstellt, in dem der Leserahmen von *hot1* unter der Kontrolle des Arabinose-induzierbaren *crg*-Promotors steht. In diesem Stamm wurden jeweils Cdc42, Rac1, die Punktmutanten Cdc42<sup>F56W</sup> und Rac1<sup>W56F</sup> beziehungsweise die chimären GTPasen C45R, R45C, C45R70C und R45C70R als GFP-Fusionsproteine ektopisch unter Kontrolle des konstitutiv-aktiven *etef*-Promotors integriert. Die Zellen wurden unter nicht-induzierenden (Aus) und induzierenden (An) Bedingungen angezogen. Die Proteinextrakte von *U. maydis* Zellen der verschiedenen Stämme wurden in einem SDS-Gel aufgetrennt, auf eine PVDF Membran transferiert und die GFP-Fusionsproteine der verschiedenen GTPasen mittels eines anti-GFP-Antikörpers nachgewiesen. Als Ladekontrolle diente eine Pronceau-Färbung. Für die CRIB-Präzipitation wurde die CRIB-Domäne von Ste20 als GST-Fusionsprotein in *E. coli* überexprimiert und über Affinitäts-Chromatographie aufgereinigt. Gleiche Anteile der GST-CRIB-Domäne wurden mit gleichen Mengen der Proteinextrakten der verschiedenen Stämme, inkubiert. Die Komplexe wurden mit Hilfe von GSH-Agarose präzipitiert, im SDS-Gel aufgetrennt und auf eine PVDF Membran transferiert. Die anti-GFP-markierten GTPasen wurden mit Hilfe eines monoklonalen GFP-Antikörpers nachgewiesen. (B) Das Diagramm zeigt Mittelwerte dreier unabhängiger Versuche. Es ist anzumerken, dass die Menge an GTPase bei einer Aktivierung der jeweiligen GTPase nach Induktion des *crg*-Promotors abnahm. Aus diesem Grund wurden die Werte von der eingesetzten Proteinmenge zur detektierten GTPase Menge mit der Faktor, um den die Proteinmenge abnahm, verrechnet. Nach Angleichung ist in der CRIB-Präzipitation zu sehen, dass Hot1 auch *in vivo* Cdc42, die Punktmutante Cdc42<sup>F56W</sup>, aber auch die chimären GTPasen C45R und C45R70C aktivieren kann.

Aminosäuren aus Rac1 besteht und den restlichen 35 Aminosäuren aus Cdc42, die nicht mehr von Hot1 aktiviert werden kann. Im Fall von Rac1 scheint die Erkennung durch Hot1 durch die C-terminale Region zu erfolgen. Abbildung 2.13 zeigt, dass die chimäre GTPase R157C im Vergleich zum Wildtyp-Rac1 kaum noch aktiviert werden kann. Scheinbar erkennt Hot1 die Rac1 über die C-terminale Region. Als Kontrolle wurden wiederum die RhoGEFs Cdc24 und Don1 verwendet. Während Cdc24 R157C sehr effektiv aktivieren kann, ist Don1 dazu nicht in der Lage. Diese Ergebnisse können mit den früheren Resultaten erklärt werden, da die GTPase R157C die spezifitätsbestimmende Aminosäure für Cdc24 enthält und nicht die für Don1.

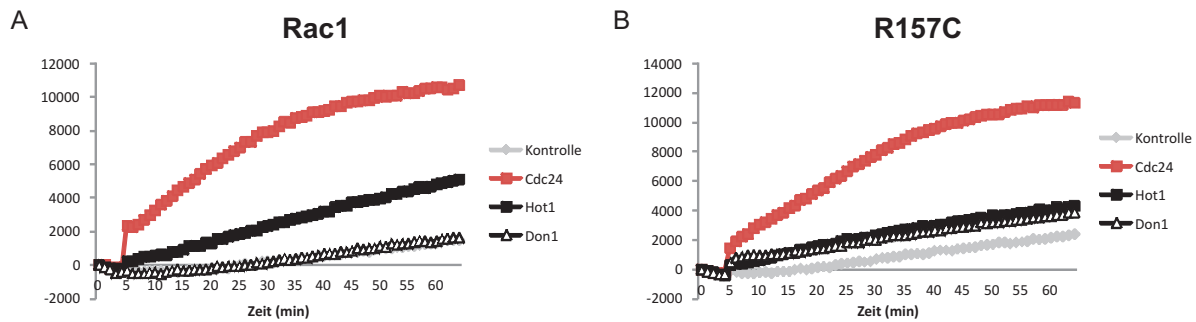


Abbildung 2.13: Die C-terminale Region von Rac1 ist wichtig für die Aktivierung durch Hot1.

Dargestellt sind die *in vitro* GEF Assays der Wildtyp GTPase Rac1 und der chimären GTPase R157C. (A) Aktivierung von Rac1 durch die verschiedenen RhoGEFs Hot1, Don1 und Cdc24. (B) Aktivierung der chimären GTPase R157C durch Hot1, Don1 und Cdc24. Wird der C-Terminus von Rac1 gegen den C-Terminus von Cdc42 ausgetauscht, verliert Hot1 die Fähigkeit Rac1 zu aktivieren. Cdc24 ist weiterhin in der Lage Rac1 auch mit dem C-Terminus von Cdc42 zu aktivieren, während Don1 keine Austauschaktivität aufweist.

Die GEF-Assays wurden jeweils mit einer Endkonzentration von 1  $\mu$ M GST-Hot1-DH, GST-Don1, GST-Cdc24-DH-PH, GST-Cdc42, GST-Rac1 und GST-R157C durchgeführt. Auf der y-Achse ist die relative Fluoreszenz aufgetragen.

### 2.2.5 Der humane RhoGEF TUBA benutzt einen ähnlichen Determinationsmechanismus wie der RhoGEF Hot1

Im Gegensatz zu *U. maydis* besitzt das humane Homolog zu Hot1, TUBA, keinerlei Austauschaktivität gegenüber Rac1 oder RhoA (Salazar et al., 2003). Aufgrund der hohen Sequenzähnlichkeit zu Hot1 wurde untersucht, ob TUBA einen ähnlichen Selektionsmechanismus benutzt, wie Hot1. Es wurde überprüft, ob die Aminosäure 56 aus Cdc42 ebenfalls keinen Einfluss auf die Spezifitätsdetermination von TUBA hat. Dazu wurde die katalytische DH-Domäne von TUBA als GST-Fusionsprotein in *E. coli* überexprimiert und über Affinitäts-Chromatographie gereinigt.

Anschließend wurde in einem *in vitro* GEF-Assay der TUBA-katalysierte Nukleotid-Austausch an den beiden humanen GTPasen Cdc42 und Rac1, sowie den jeweiligen Punktmutanten, Cdc42<sup>F56W</sup> und Rac1<sup>W56F</sup>, gemessen. Als Kontrolle wurde in diesem Experiment die katalytische DH-Domäne von Hot1 verwendet.

Aufgrund der vielen zusätzlichen Banden, die im SDS-Gel nach der Aufreinigung der DH-Domäne von TUBA zu sehen waren und die auf einen partiellen Abbau schließen lassen (siehe Abb. 2.7), wurde eine höhere Konzentration (3  $\mu$ M anstelle von den bisher eingesetzten 1  $\mu$ M GST-RhoGEF) für den *in vitro* GEF-Assay eingesetzt. Wie in Abbildung 2.14 dargestellt ist, kann Cdc42 von TUBA aktiviert werden. Auch Hot1 ist dazu in der Lage, den Nukleotid-Austausch an der humanen GTPase Cdc42 sehr effektiv zu katalysieren. Allerdings ist TUBA, ebenso wie Hot1, dazu in der Lage, die humane GTPase Rac1 schwach zu aktivieren. Dies steht im Widerspruch zu den Ergebnissen aus dem humanen System. Diese beschreiben TUBA als rein Cdc42-spezifischen RhoGEF. Interessanterweise weisen auch die Punktmutanten, Cdc42<sup>F56W</sup> und Rac1<sup>W56F</sup>, im Vergleich zu den Wildtyp-GTPasen, Cdc42 und Rac1, kein verändertes Ver-



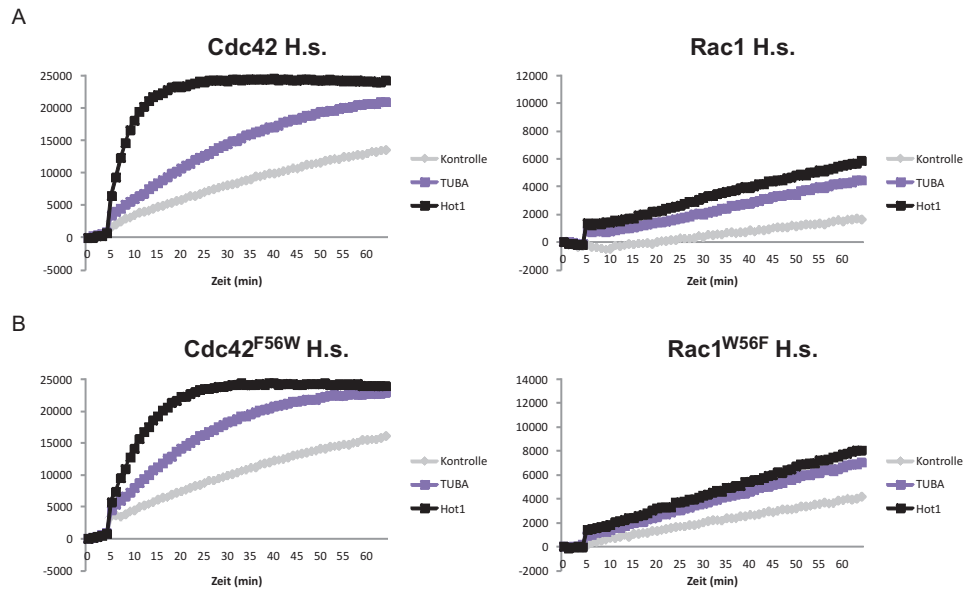


Abbildung 2.14: **GEF-Aktivität des humanen RhoGEFs TUBA.**

(A) In einem *in vitro* GEF-Assay wurde die katalytische DH-Domäne des humanen RhoGEFs TUBA auf die Fähigkeit hin untersucht, den Nukleotid-Austausch an den humanen GTPasen Cdc42 und Rac1 zu katalysieren. Hot1 diente in diesem Experiment als Kontrolle und zeigt, dass der RhoGEF aus *U. maydis* auch die humanen GTPasen aktivieren kann. Wie Hot1, zeigt auch TUBA eine gute Nukleotid-Austausch-Aktivität gegenüber Cdc42. Rac1 hingegen kann von beiden RhoGEFs nur sehr schwach aktiviert werden. (B) Um zu überprüfen, ob die Aminosäure 56 ebenfalls keinen Einfluss auf die Spezifitätsdetermination von TUBA hat, wurden die Aminosäure-Austausche an Position 56 ebenfalls in den humanen GTPasen eingeführt und im *in vitro* GEF-Assay getestet. Das Experiment zeigt, dass der Austausch an Position 56 zwischen den GTPasen Cdc42 und Rac1 keinen Einfluss auf die Spezifitätsdetermination von Hot1 hat.

3  $\mu\text{M}$  GST-TUBA-DH und 2  $\mu\text{M}$  GST-Hot1-DH haben die gleichen katalytischen Eigenschaften gegenüber GST-Rac1 und GST-Rac1<sup>W56F</sup>, die mit einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  eingesetzt wurden. In der Reaktion mit GST-Cdc42 und der Mutante GST-Cdc42<sup>F56W</sup> (1  $\mu\text{M}$ ) wurden GST-TUBA-DH und GST-Hot1-DH ebenfalls mit einer Konzentration von 2  $\mu\text{M}$  verwendet. Auf der y-Achse ist die relative Fluoreszenz aufgetragen.

halten gegen über TUBA auf (siehe Abb. 2.14 (B)). Die Punktmutante von Cdc42, Cdc42<sup>F56W</sup>, kann ebenso effektiv von TUBA aktiviert werden wie Wildtyp-Cdc42. Auch der Austausch von Tryptophan gegen Phenylalanin in Rac1 hat keinen Effekt auf die Aktivierung durch TUBA. Hot1 zeigt gegenüber den humanen Punktmutanten das gleiche Verhalten wie gegenüber den GTPasen aus *U. maydis*. Die Aminosäure 56 aus Cdc42 und Rac1 scheint ebenfalls keinen Einfluss auf die Spezifitätsdetermination des RhoGEFs TUBA zu haben.

## 2.2.6 Kristallisationsversuch der katalytischen DH-Domäne von Hot1

Um einen näheren Einblick in den Spezifitätsmechanismus von Hot1 zu bekommen, wurde versucht, die katalytische DH-Domäne von Hot1 zu kristallisieren. Dazu wurde die DH-Domäne als GST-Fusionsprotein in *E. coli* Arctic Express Zellen bei 17°C überexprimiert. Der erste chromatographische Schritt war die Aufreinigung mittels GST-Affinitäts-Chromatographie. Anschließend wurde der GST-Teil des Fusionsproteins mit Hilfe einer Thrombin-Protease ab-

## 2 Ergebnisse

gespalten. Die DH-Domäne von Hot1 besitzt selbst keine intrinsische Thrombin-Schnittstelle, allerdings verfügt der verwendete Expressionsvektor über eine Thrombin-Erkennungssequenz. Diese ermöglicht eine proteolytische Abspaltung des GST-Tags.

Die Proteolyse erfolgte über eine Zeitdauer von 16 h bei 20°C und wurde durch Zusatz von 1 mM PMSF abgestoppt. Die zugesetzten Substanzen Thrombin und PMSF und das abgespaltene GST wurden mittels einer nachfolgenden Größenausschlusschromatographie entfernt. Die Größenausschlusschromatographie lieferte ein reines Protein (siehe Abbildung 2.15). Nach Ankonzentration mit Amicon-Ultra-Konzentratoren (Millipore) wurde eine Protein-Ausbeute von 20 mg/ml erzielt.

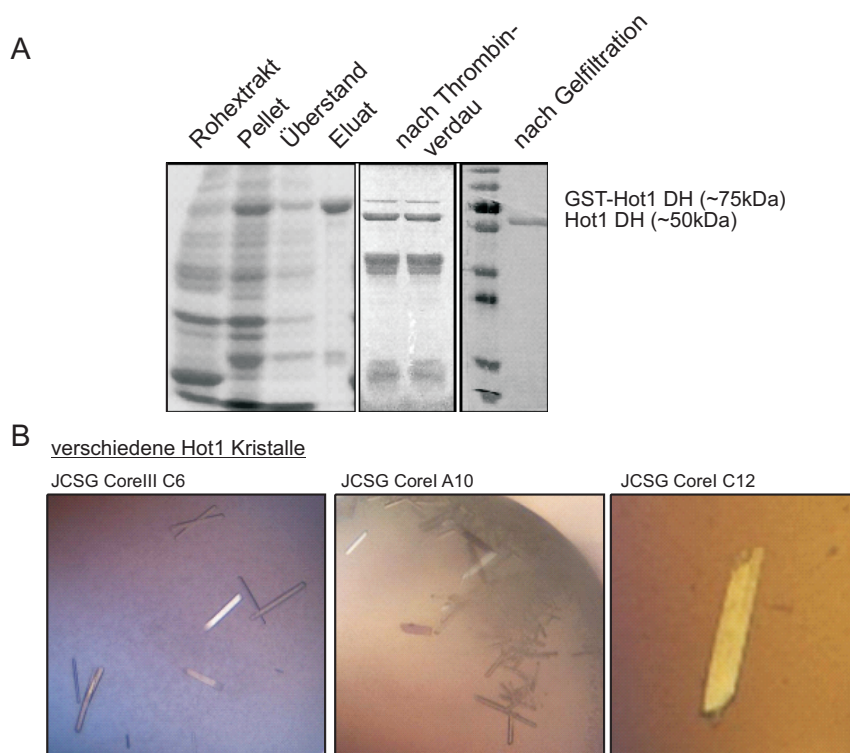


Abbildung 2.15: **Kristallisationsversuch der katalytischen DH-Domäne von Hot1.**

Um einen näheren Einblick in den Determinationsmechanismus von Hot1 zu bekommen, wurde versucht die katalytische DH-Domäne von Hot1 zu kristallisieren. **(A)** Dazu wurde die DH-Domäne von Hot1 als GST-Fusionsprotein in *E.coli* exprimiert und über Affinitäts-Chromatographie gereinigt. Das erhaltene GST-DH Fusionsprotein wurde mit der Protease Thrombin geschnitten, um den GST-Tag abzuspalten. Zur weiteren Aufreinigung wurde das Eluat nach dem Thrombinverdau einer Größenausschlusschromatographie unterzogen. Die DH-Domäne von Hot1 konnte in hoher Reinheit isoliert werden und für einen Kristallisationsansatz eingesetzt werden. **(B)** In drei verschiedenen Kristallisationsbedingungen kam es zu Ausbildung von unterschiedlichen Kristallformen. Die resultierenden Kristalle wurden anschließend für Röntgenbeugungsexperimente verwendet. Leider war es nicht möglich, Kristalle mit geeigneten Streuverhalten zu erzeugen, die zur Strukturauflösung genutzt werden konnten.

Die weiteren Experimente wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Holger Steuber aus der AG Essen durchgeführt. Bisher gibt es keine verlässliche Möglichkeit vorher zusagen, unter welchen

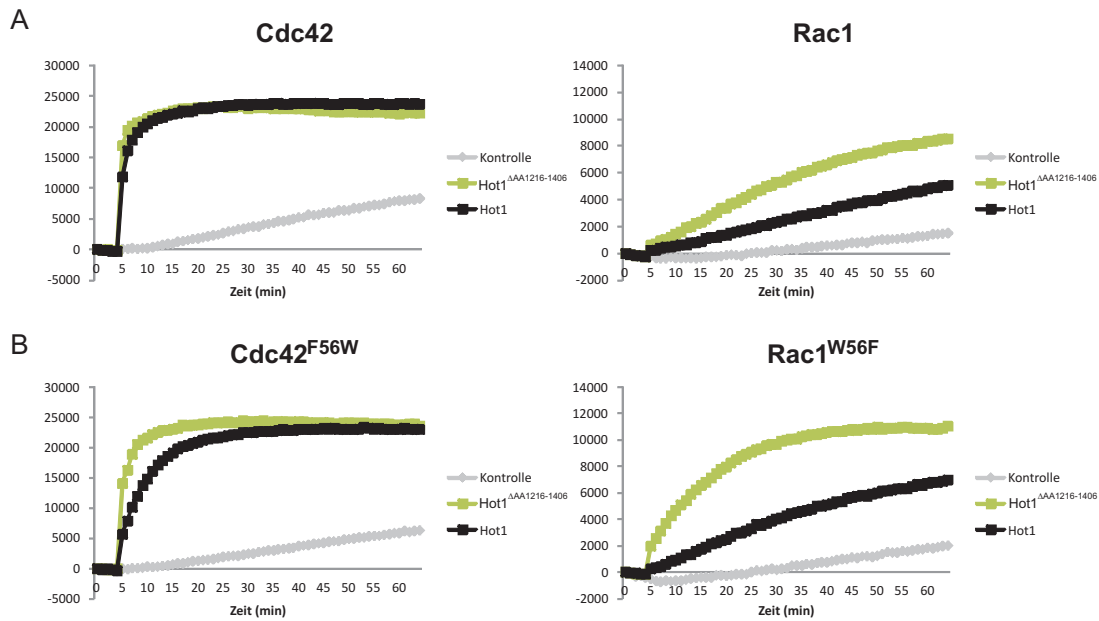
Bedingungen aus einem bestimmten Protein Kristalle entstehen. Aus dem Grund wurden in einem ersten Schritt eine große Menge an Kristallisationsbedingungen getestet, die bereits in vielen anderen Fällen zuvor zur Proteinkristallbildung geführt haben, die so genannten "*sparse-matrix-screens*". Es wurden automatisiert 300 nL Proteinlösung mit einer Proteinkonzentration von 10 mg/ml mit 300 nL der jeweiligen Präzipitationslösung in verschiedene 96 well Innova-plates (Innovadyne) gemischt. Hierbei enthielt jedes Well eine unterschiedliche Pufferbedingung. Da die verwendeten Kristallisationsplatten zwei Vertiefungen für die Aufnahme von Proteintropfen haben, wurde zusätzlich ein Kontrolltropfen nur mit dem Puffer, in dem das Protein gelöst war, gesetzt. Alle Ansätze wurden im *sitting-drop* durchgeführt. Die Bedingungen, die zur Kristallisation der DH-Domäne führten, waren Bedingung C6 aus dem Screen JCSG Core III (0,2 M Calciumchlorid, 0,1 M HEPES pH7,5, 28% PEG400), Bedingung C12 aus dem Screen JCSG Core I (0,2 M Natriumthiocyanat, 20% PEG 3,350) sowie Bedingung A10 aus dem Screen JCSG CoreI (0,2 M Calciumacetat, 0,1 M Imidazol, 20% PEG 1,000). Die resultierenden Kristalle wurden für Röntgenbeugungsexperimente verwendet. Leider gelang es im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht, Kristalle mit einem geeigneten Streuverhalten zu erzeugen, die zu einer Strukturauflösung genutzt werden konnten. Die Auflösung der Kristalle lag nach den Röntgenbeugungsexperimenten nur bei 5-6 Angström. Diese Auflösung ist für eine genaue Strukturvorhersage nicht ausreichend.

### 2.2.7 Die Deletion der Insertion der katalytischen Domäne von Hot1 führt zu einem gesteigerten Nukleotid-Austausch an Rac1

Wie bereits in Abbildung 2.1 dargestellt, weist die katalytische DH-Domäne von Hot1 eine Insertion zwischen den konservierten Regionen CR1 und CR2 der Domäne auf. Diese Insertion von etwa 200 Aminosäuren könnte ein möglicher Grund dafür sein, dass das Streuverhalten der erhaltenen Proteinkristalle zur Strukturauflösung nicht ausreichend genug war. Da es sich bei Insertionen häufig um unstrukturierte Bereiche handelt, können diese störend bei der Kristallisation sein. Oftmals ist es möglich, durch Deletion von unstrukturierten Bereichen die Kristallisationseigenschaften von Proteinen zu verbessern. Aus diesem Grund wurde die Insertion der DH-Domäne von Hot1 deletiert. Die Fragmentgrenzen, um die Insertion zu deletieren, lagen in der Region zwischen der Region CR1 und CR2 (siehe Material und Methoden). Durch Sequenzvergleiche mit anderen DH-Domänen wurde versucht, die Fragmentgrenze so zu platzieren, dass die konservierte Grundstruktur der Domäne durch die Deletion nicht beeinträchtigt wird. Zunächst wurde getestet, ob die Deletion der Insertions-Region von Hot1 Auswirkungen auf die katalytische Aktivität von Hot1 hat. Wie in Abbildung 2.16 dargestellt ist, zeigt die entstandene Domäne Hot1-DH<sup>ΔAA1216-1406</sup> immer noch katalytische Aktivität und kann den Nukleotid-Austausch an Cdc42 katalysieren.

Dies zeigt, dass die Insertionsregion nicht am eigentlichen Mechanismus des Nukleotid-Austauschs beteiligt ist. Interessanterweise führt die Deletion der Insertion der katalytischen DH-Domäne von Hot1 zu einer verminderten Selektivität des RhoGEFs für Cdc42 und Rac1. Die Wildtyp-Variante der Hot1-DH-Domäne aktiviert bevorzugt Cdc42 und aktiviert Rac1 nur schwach. Der Verlust der Insertion führt allerdings zu einem gesteigerten Nukleotid-Austausch

## 2 Ergebnisse



**Abbildung 2.16: Die Deletion der Insertion der katalytischen DH-Domäne von Hot1 führt zu einem gesteigerten Nukleotid-Austausch an Rac1.**

Um zu untersuchen, ob eine Deletion der Insertion der DH-Domäne von Hot1 die katalytische Aktivität dieser Domäne zerstört, wurde dies in einem *in vitro* GEF-Assay untersucht. **(A)** Hot1-DH<sup>ΔAA1216-1406</sup> zeigt eine sehr starke Nukleotid-Austausch-Aktivität gegenüber Cdc42. Interessanterweise kann Rac1 von Hot1-DH<sup>ΔAA1216-1406</sup> besser aktiviert werden, als von der Wildtyp-Variante der DH-Domäne. **(B)** Der Austausch der Aminosäure 56 zwischen Cdc42 und Rac1 zeigt ebenfalls keinen Einfluss auf die Spezifitätsdetermination der Deletionsvariante der DH-Domäne von Hot1. Auch die Mutante Rac1<sup>W56F</sup> kann von Hot1-DH<sup>ΔAA1216-1406</sup> besser aktiviert werden als von dem Hot1-Wildtyp. Die GEF-Assays wurden jeweils mit einer Endkonzentration von 1  $\mu$ M GST-Hot1-DH<sup>ΔAA1216-1406</sup>, GST-Cdc42, GST-Rac1, GST-Cdc42<sup>F56W</sup> und GST-Rac1<sup>W56F</sup> durchgeführt. Auf der y-Achse ist die relative Fluoreszenz aufgetragen.

an Rac1. Dieser Verlust der Selektivität ist auch an den Punktmutanten der GTPasen zu erkennen. Auch die Punktmutante von Rac1, Rac1<sup>W56F</sup>, kann durch Hot1-DH<sup>ΔAA1216-1406</sup> deutlich besser aktiviert werden, als die Wildtyp-Variante (siehe Abb. 2.16). Anscheinend wurde die Struktur der katalytischen Domäne von Hot1, durch die Deletion der Insertion, in eine neue Konformation gebracht, welche die Selektivität gegenüber den beiden kleinen GTPasen Cdc42 und Rac1 verliert. Alternativ ist die Insertion an der Unterscheidung zwischen Rac1 und Cdc42 beteiligt. Eine von Hot1-DH<sup>ΔAA1216-1406</sup> abgeleitete Kristallstruktur kann jedoch keine Hinweise darauf liefern, wie die Unterscheidung zwischen Cdc42 und Rac1 auf struktureller Ebene funktioniert. Aus diesem Grund wurden die Kristallisationsversuche mit dieser Domäne nicht weiter verfolgt.

Da allerdings mit dieser verkürzten DH-Domäne ein Nukleotid-Austausch-Faktor hergestellt werden konnte, der sowohl Rac1 als auch Cdc42 effektiv erkennen kann, stellte sich die Frage, ob dieser Verlust der Selektivität eine Auswirkung auf die *in vivo*-Funktion von Hot1 hat. Um dies zu überprüfen, wurde eine Hot1<sup>ΔAA1216-1406</sup>-Mutante generiert und charakterisiert. Haploide Zellen, in denen die Insertions-Region der Hot1-DH-Domäne deletiert ist, weisen keinen veränderten Phänotyp auf.

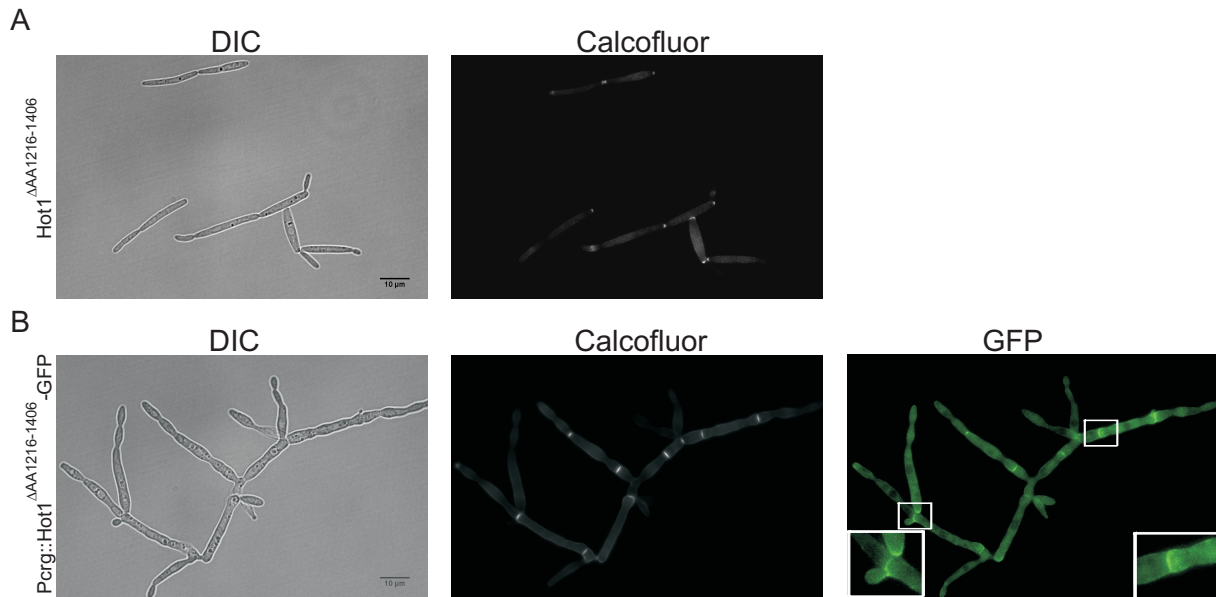


Abbildung 2.17: Die Überexpression der *Hot1*<sup>ΔAA1216-1406</sup>-Mutante führt zu einer abnormalen Zellmorphologie.

Der GEF-Assay der *Hot1* DH<sup>ΔAA1216-1406</sup>-Mutanten zeigte eine veränderte Aktivierung gegenüber Rac1. Um zu überprüfen, ob diese veränderte Aktivierung einen *in vivo* Effekt zur Folge hat, wurde eine *Hot1*<sup>ΔAA1216-1406</sup>-Mutanten generiert. Desweiteren konditionale *Hot1*<sup>ΔAA1216-1406</sup>-Mutanten, welche unter Kontrolle des induzierbaren *crg*-Promotors steht, hergestellt. (A) Phänotyp von *Hot1*<sup>ΔAA1216-1406</sup>-Mutanten. Die Zellwände wurden mit Calcofluor-White angefärbt. Die Deletion der Insertion der DH-Domäne hat keinen morphologischen Effekt. Die Calcofluorfärbung zeigt die Bildung von regulären Doppelsepten. Gelegentlich kommt es zur Ausbildung von kettenförmigen Zellaggregaten aus 4 Zellen. (B) Erscheinungsbild von Zellen, die die *Hot1*<sup>ΔAA1216-1406</sup>-Mutante am genomischen Locus überexprimieren. Die Zellen wurden für 14 Stunden in induzierendem Flüssigmedium inkubiert. Die Zellwände wurden ebenfalls mit Calcofluor-White angefärbt. Die Überexpression von *Hot1*<sup>ΔAA1216-1406</sup> resultiert in einer veränderten Zellmorphologie. Die Zellen sind leicht abgerundet und weisen einen Zellteilungsdefekt auf. Die Calcofluorfärbung zeigt, dass keine regulären Doppelsepten gebildet werden. Diese Mutante wurde C-terminal mit GFP fusioniert. Die Lokalisation von *Hot1*<sup>ΔAA1216-1406</sup>-GFP Fluoreszenz wurde mikroskopisch analysiert. *Hot1*<sup>ΔAA1216-1406</sup>-GFP lokalisiert an kleinen Partikeln unter der Plasmamembran und bildet scharf abgrenzende Akkumulation am Septum.

Nur gelegentlich ist ein leichter Zelltrennungsdefekt zu beobachten. Hierbei kommt es zur Ausbildung von kettenförmigen Zellaggregaten aus vier Zellen. Die Färbung der Zellen mit Calcofluor zeigt allerdings die Bildung von regulären Doppelsepten. Aus früheren Experimenten war bekannt, dass die Überexpression von GTPasen und RhoGEFs starke Phänotypen hervorrufen kann. In *U. maydis* konnte dies insbesondere für Rac1 und Rac1-spezifische RhoGEFs beobachtet werden, während die Überexpression von Cdc42-spezifischen GEFs oftmals keine Effekte auslöst. Aus diesem Grund wurde getestet, ob die Fähigkeit von *Hot1*<sup>ΔAA1216-1406</sup>, Rac1 zu aktivieren, ähnliche Effekte auslösen kann. Hierzu wurde eine *Hot1*<sup>ΔAA1216-1406</sup>-Mutante generiert, bei welcher der Promotor von *Hot1* durch den induzierbaren *crg*-Promotor ersetzt wurde. Die Überexpression von *Hot1*<sup>ΔAA1216-1406</sup> resultiert in einer veränderten Zellmorphologie. Die Zellen sind leicht abgerundet und weisen eine Zellteilungsdefekt auf. Die Calcofluorfärbung zeigt, dass keine regulären Doppelsepten gebildet werden. Im Vergleich dazu löst die Überexpression von *Hot1* alleine keinerlei Veränderung des Phänotyps auf.

Um die intrazelluläre Lokalisation von Hot1<sup>ΔAA1216-1406</sup> zu untersuchen, wurde diese Mutante C-terminal mit GFP fusioniert und die Lokalisation von Hot1<sup>ΔAA1216-1406</sup>-GFP Fluoreszenz mikroskopisch analysiert. Wie in Abbildung 2.17 (B) zu sehen ist, lokalisiert Hot1<sup>ΔAA1216-1406</sup>-GFP an kleinen Partikeln unter der Plasmamembran. Diese Lokalisierung entspricht auch der Lokalisierung der Wildtyp-Variante von Hot1. Allerdings bildet Hot1<sup>ΔAA1216-1406</sup> außerdem eine scharf abgrenzende Akkumulation am Septum, während die Wildtyp-Variante als Sanduhren-förmige Struktur am "*Mother-Bud-Neck*" lokalisiert. Interessant ist, dass diese Phänotypen deutlich stärker sind als diejenigen, die bei einer Deletion von Hot1 zu beobachten sind. Es scheint also, dass Hot1<sup>ΔAA1216-1406</sup> als konstitutiv aktiver GEF wirkt und eine Überaktivierung von Rac1 auslöst. Alternativ könnte es sein, dass die Insertion auch eine regulative Wirkung auf die GEF-Funktion hat, die unabhängig von der Nukleotid-Austauschaktivität ist.

### 2.3 Signalspezifität wird durch ein Zusammenspiel von Aktivatoren, GTPasen und Effektoren erreicht

Kleine GTPasen dienen oft als zentrale Schalter, die nicht nur in unterschiedlichen Signalkaskaden fungieren können, sondern sogar mehrere Signalkaskaden zu komplexen Signal-Netzwerken verknüpfen können. Oftmals hat die gleiche GTPase verschiedene Aktivatoren und bindet verschiedene Effektormoleküle. Darüber hinaus können Effektormoleküle oftmals von mehr als einer GTPase aktiviert werden. Sind Cdc42 und Rac1 in einem Organismus vorhanden, übernehmen diese beiden GTPasen oft sowohl getrennte als auch gemeinsame Funktionen. Vielfach sind Cdc42 und Rac1 alleine in diesen Organismen nicht essentiell, während  $\Delta cdc42/\Delta rac1$ -Doppelmutanten nicht lebensfähig sind (Mahlert et al., 2006; Virag et al., 2007; Kwon et al., 2011). Angesichts dieser teilweise redundanten Funktion stellte sich die Frage, ob man die Funktionen der beiden GTPasen Cdc42 und Rac1 durch ein einziges Protein vermitteln kann. Dies ist im Laufe der Evolution einige Male geschehen. So besitzt z.B. *S.cerevisiae* kein Rac1-Homolog, während *Dictyostelium discoideum* kein Cdc42-Protein besitzt. In *U. maydis* gibt es mit Cdc42 eine GTPase, die *in vitro* sowohl von Cdc42-spezifischen GEFs, aber auch in gewissem Maße von dem Rac1-spezifischen RhoGEF Cdc24 aktiviert werden kann. Dennoch erfüllt Cdc42 nicht alle essentiellen Funktionen *in vivo*. So führt die Überexpression von Rac1, nicht aber die Überexpression von Cdc42, zur Induktion von filamentösem Wachstum (Mahlert et al., 2006). Es stellt sich die Frage, warum in *U. maydis* die kleine GTPase Cdc42, die sowohl von Cdc42- als auch von dem Rac1-spezifischen RhoGEFs Cdc24 aktiviert werden kann, nicht alle Funktionen übernehmen kann. Gerade für die Frage, wie man in Signal-Netzwerken eine spezifische Signalantwort erreichen kann, wäre eine universelle GTPase ein wichtiges Werkzeug, um die Komplexität dieses Systems zu verringern. Dies würde es ermöglichen spezifische Signalwege zu untersuchen. Daher wurde versucht, eine GTPase zu generieren, die alle diese Anforderungen erfüllen kann: eine Aktivierung durch alle essentiellen RhoGEFs, eine Interaktion mit allen essentiellen Effektoren und eine korrekte Lokalisation.

### 2.3.1 Die chimäre GTPase C157R kann sowohl von Cdc42- als auch von Rac1-spezifischen GEFs aktiviert werden

Im Zuge des Screens zur Identifizierung der spezifitätsdeterminierenden Region von Cdc42 und Rac1 für Hot1 wurde eine chimäre GTPase hergestellt, die zumindest *in vitro* diese Anforderungen erfüllt (siehe Abbildung 2.18 und 2.10). Der GEF-Assay mit der chimären GTPase C157R zeigt, dass dieses Protein sowohl von den Cdc42-spezifischen RhoGEFs Don1 und Hot1, als auch von dem Rac1-spezifischen RhoGEF Cdc24 aktiviert werden kann. Insbesondere die Aktivierung durch Cdc24 verdient dabei eine nähere Betrachtung, da Cdc24 in *U. maydis* ein Rac1-GEF ist, der Cdc42 nur sehr schwach aktivieren kann. Interessanterweise kann die GTPase C157R von Cdc24 besser aktiviert werden als Wildtyp-Cdc42. Die Aktivierung fällt allerdings etwas schwächer aus als die von Wildtyp-Rac1, da die Reaktion während der Messzeit nicht die Sättigung erreicht. Trotz allem konnte mit der C157R eine GTPase generiert werden, die *in vitro* ebenfalls von Cdc42- als auch Rac1- spezifischen RhoGEFs aktiviert werden kann.

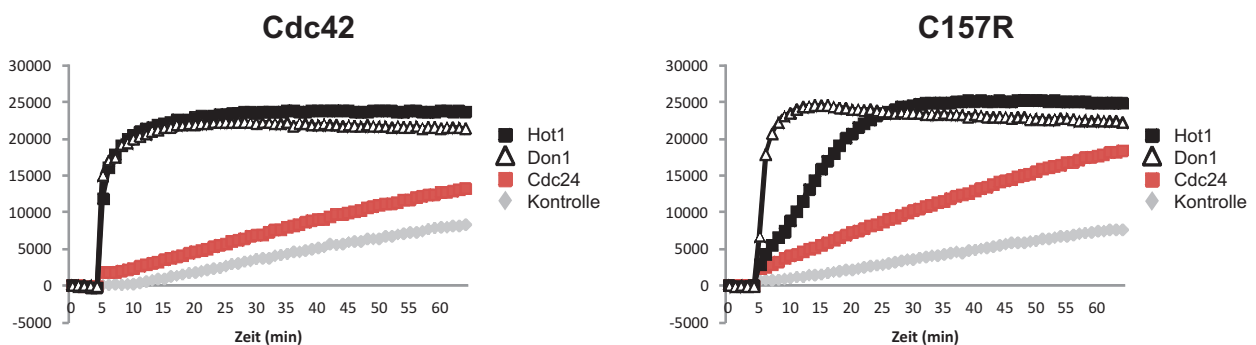


Abbildung 2.18: Die chimäre GTPase C157R kann sowohl von Cdc42- als auch von Rac1-spezifischen GEFs aktiviert werden.

Ein *in vitro* GEF-Assay zeigt, dass die chimäre GTPase C157R, die aus den ersten 157 Aminosäuren von Cdc42 und den restlichen 37 Aminosäuren von Rac1 besteht, durch die katalytischen DH-Domäne von sowohl Don1 und Hot1 als auch von dem DH-PH Motiv von Cdc24 aktiviert werden kann. Im Vergleich dazu sind ebenfalls die Nukleotid-Austausch-Aktivitäten der einzelnen GEFs an Wildtyp-GTPase Cdc42 dargestellt.

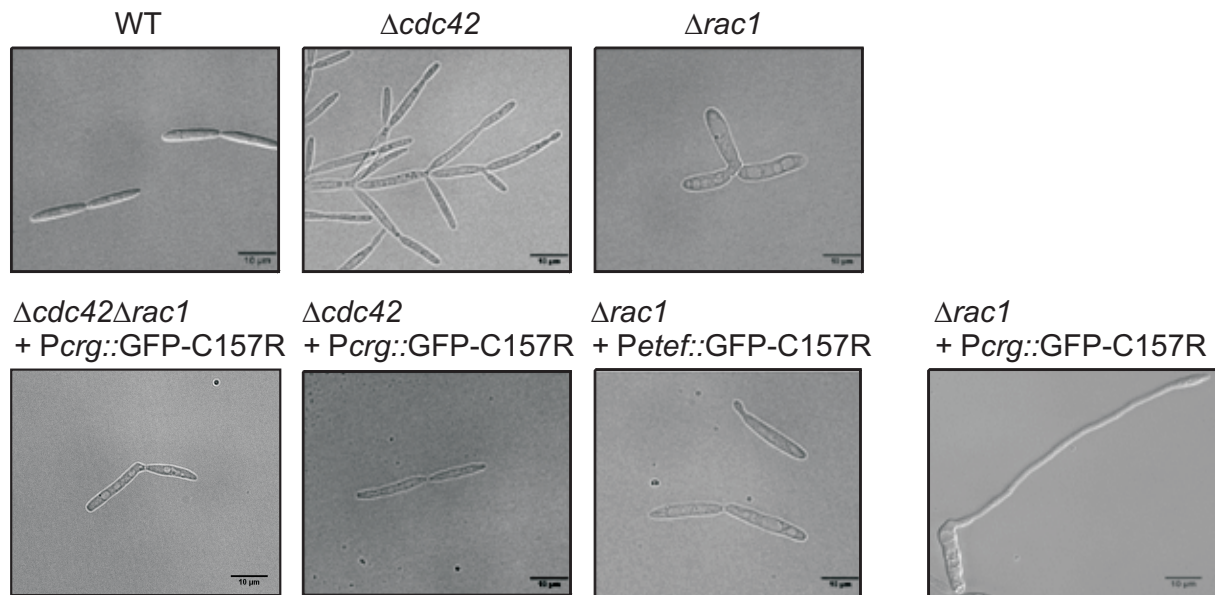
Die GEF-Assays wurden jeweils mit einer Endkonzentration von 1  $\mu$ M GST-Hot1-DH, GST-Don1, GST-Cdc24-DH-PH, GST-Cdc42 und GST-C157R durchgeführt. Auf der y-Achse ist die relative Fluoreszenz aufgetragen.

### 2.3.2 Die chimäre GTPase C157R kann die Deletionsphänotypen von Cdc42 und Rac1 komplementieren

Cdc42 und Rac1 haben verschiedene Funktionen in der Zelle und weisen ganz unterschiedliche Phänotypen auf. Cdc42 ist an der Bildung des sekundären Septums beteiligt, welches für die korrekte Zelltrennung benötigt wird, während Rac1 hauptsächlich Funktionen bei der Zellmorphologie (Mahlert et al., 2006). Mit der chimären GTPase C157R wurde eine Art universelle GTPase generiert, die effizient von sowohl Cdc42- als auch Rac1-spezifischen RhoGEFs aktiviert werden kann. Es stellte sich Frage, ob diese chimäre GTPase dazu in der Lage ist, die verschie-



denen Deletionsphänotypen von Cdc42 und Rac1 zu komplementieren. Dazu wurde die chimäre GTPase ektopisch in den *ip*-Lokus von  $\Delta cdc42$  und  $\Delta rac1$ -Mutanten unter Kontrolle des *etef*- beziehungsweise des *crg*-Promotors integriert.



**Abbildung 2.19: Die Expression der chimären GTPase C157R kann die Deletionsphänotypen von sowohl Cdc42 als auch Rac1 komplementieren.**

Die chimäre GTPase C157R wurde in  $\Delta cdc42$ - als auch in  $\Delta rac1$ -Mutanten exprimiert. Die Überexpression von C157R ist in der Lage den Zelltrennungsdefekt von *cdc42* zu komplementieren. In  $\Delta rac1$ -Mutanten ist die Expression unter Kontrolle des *etef*-Promotors ausreichend, den Zellmorphologiedefekt der Deletionsmutante zu komplementieren. Eine Überexpression der chimären GTPase C157R in  $\Delta rac1$  resultiert in der Ausbildung von Filament-ähnlichen Strukturen.

Die chimäre GTPase C157R kann die Deletionsphänotypen von sowohl Cdc42 als auch Rac1 retten (Abb. 2.19). Die Expression von Rac1 unter Kontrolle des konstitutiven *etef*-Promotors genügt, um den Morphologie-Defekt von  $\Delta rac1$ -Mutanten zu retten. Die starke Überexpression von Rac1 induziert in haploiden Zellen filamentöses Wachstum (Mahlert et al., 2006). Auch die Überexpression von C157R führt sowohl in haploiden Wildtyp-Zellen, als auch in  $\Delta rac1$ -Mutanten zur Hyperpolarisation und zu filamentösem Wachstum (Abb. 2.19). Allerdings waren diese induzierten Filamente im Vergleich zu Filamenten, die durch die Überexpression von Rac1 entstanden, weniger lang. Im Vergleich zur Komplementation von  $\Delta rac1$  muss die chimäre GTPase C157R in  $\Delta cdc42$ -Zellen stark überexprimiert werden, um den Zelltrennungsdefekt einer *cdc42*-Deletionsmutante zu komplementieren (Abb. 2.19). Darüber hinaus führte selbst eine starke Überexpression von C157R in diesem Hintergrund nicht zur Induktion von Filamenten. Angesichts der Tatsache, dass eine *rac1*-Deletion vollständig komplementiert werden kann, scheint es eine für das filamentöse Wachstum essentielle Funktion von Cdc42 zu geben. Diese Funktion kann von der chimäre GTPase C157R nicht übernommen werden. Um zu testen, ob die GTPase C157R auch die gemeinsamen essentiellen Funktionen komplementieren kann, wurde in dem  $\Delta cdc42$ -Stamm, der die GTPase C157R überexprimiert, zusätzlich Rac1 deletiert. Dieser Stamm ist unter induzierenden Bedingungen lebensfähig und zeigte eine wildtypische



Zellmorphologie. C157R kann somit auch die essentielle Funktion von Cdc42 und Rac1 übernehmen. Durch die Expression der chimären GTPase C157R, konnte also ein Stamm generiert werden, in dem, ähnlich wie in zum Beispiel *S. cerevisiae* oder *D. discoideum*, eine einzige GTPase ausreichend ist, um alle essentiellen Funktionen der GTPasen Cdc42 und Rac1 auszuüben. Allerdings führt die Überexpression von C157R im *cdc42/rac1*-Doppeldeletionsstamm, wie auch im  $\Delta cdc42$ -Stamm, nicht zu einem filamentösen Wachstum.

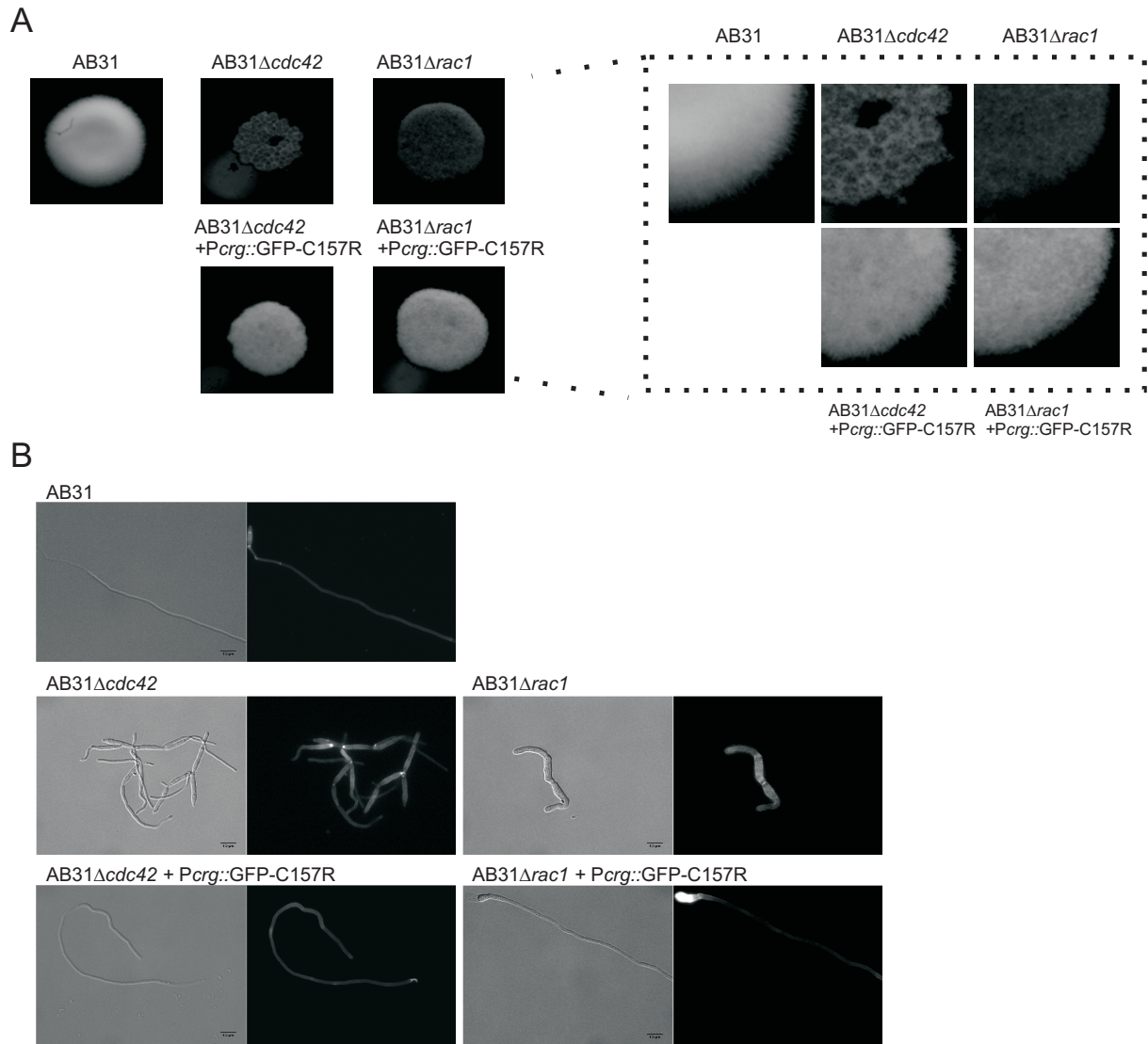
Um eine Maispflanze infizieren zu können, bildet *U. maydis* ein dikaryotisches Filament aus. In dem haploiden Stamm AB31 ist die Überexpression des funktionalen *bW2/bE1* Heterodimers unter der Kontrolle des induzierbaren *crg*-Promotors ausreichend, um das filamentöse Wachstum von *U. maydis in vivo* unabhängig von einem Paarungspartner oder der Anwesenheit einer Pflanze zu induzieren (Brachmann et al., 2001). Die Filamentinduktion wird durch das Auftropfen auf induzierendes, aktivkohlehaltiges Festmedium getestet. Die Filamentbildung wird dabei durch ein weißes Luftmycel an der Kolonieoberfläche sichtbar. Das filamentöse Wachstum ist abhängig von den beiden GTPasen Cdc42 und Rac1. Deletionsmutanten von sowohl Cdc42 als auch Rac1 sind nicht mehr dazu in der Lage, Filamente auszubilden (siehe Abb. 2.20, (Mahler et al., 2006)). Die Überexpression der GTPase C157R ist ausreichend, um den durch die Deletion von *cdc42* bzw. *rac1* ausgelösten Defekt während des filamentösen Wachstums zu komplementieren (Abb. 2.20). C157R kann also die Funktion von beiden GTPasen in diesem Kontext übernehmen. Dies ist insofern bemerkenswert, als dass die reine Überexpression von C157R in  $\Delta cdc42$ -Mutanten nicht ausreichend ist, um filamentöses Wachstum auszulösen, während dies in  $\Delta rac1$ -Zellen genügt (Abb. 2.19). Dies deutet auf einen grundlegenden Unterschied bei der Initiation von *bE/bW*-induzierten Filamenten im Vergleich zu den durch Überexpression von Rac1- beziehungsweise C157R-induzierten Filamenten hin.

Um weitere Aussagen über die Zellmorphologie der gebildeten Filamente treffen zu können, wurden die verschiedenen Stämme in Flüssigmedium für 7 Stunden unter induzierenden Bedingungen angezogen. Da filamentöse Zellen am distalen Ende Retraktionssepten zeigen, wurden die Zellwände mit Calcofluor-White angefärbt, um diese sichtbar zu machen. Wie in Abbildung 2.20 dargestellt, können Deletionsstämme, welche die chimäre GTPase C157R überexprimieren, filamentös wachsen. Auch der Zelltrennungsdefekt von  $\Delta cdc42$ , sowie der morphologische Defekt von  $\Delta rac1$  ist aufgehoben. Allerdings wachsen die Filamente in den Komplementationsstämmen langsamer als im Wildtyp-Stamm und stellen das Wachstum nach einer gewissen Zeit ein. Die Calcofluor-White Färbung zeigt, dass am distalen Ende weiterhin Retraktionssepten gebildet wurden. Diese Septen waren im Vergleich zum Wildtypstamm nicht regelmäßig und nicht in allen Zellen vorhanden. Dies könnte ein möglicher Grund für das verlangsamte Filamentwachstum sein. Zusammenfassend lässt sich jedoch sagen, dass mit der chimären GTPase C157R ein Protein generiert wurde, welches zu großen Teilen die Funktionen von Cdc42 und Rac1 in sich vereint.

### 2.3.3 Die Lokalisation einer GTPase ist wichtig für die Signalspezifität

Die chimäre GTPase C157R kann *in vitro*, ähnlich wie Cdc42, von Cdc42- und Rac1- spezifischen RhoGEFs aktiviert werden. Da sich C157R *in vivo* allerdings anders als Cdc42 verhielt,

## 2 Ergebnisse



**Abbildung 2.20: Die chimäre GTPase C157R ist in der Lage, den Filamentphänotyp der Deletionsmutanten von sowohl Cdc42 als auch Rac1 zu supprimieren.**

Um zu testen, ob die Expression der chimären GTPase C157R fähig ist, den Filamentphänotyp der Deletionsmutanten von Cdc42 und Rac1 zu komplementieren, wurde C157R unter Kontrolle des *crg*-Promotors ektopisch in den *ip*-Lokus von AB31Δcdc42- und AB31Δrac1- Stämmen integriert. Der Stamm AB31 exprimiert ein aktives Heterodimer aus *bW2* und *bE1* unter Kontrolle des *crg*-Promotors, welches bei Induktion zur Ausbildung von Filamenten führt. **(A)** Wildtyp- und Δcdc42 bzw. Δrac1-Zellen, die die chimäre GTPase C157R unter Kontrolle des *crg*-Promotors exprimieren, wurden auf induzierendes aktivkohlehaltiges Festmedium aufgetropft. Filamentbildung wird durch ein weißes Luftmycel an der Kolonieoberfläche angezeigt. Weder die Deletionsmutante von *cdc42* noch die von *rac1* ist in der Lage, Filamente auszubilden. Doch die Expression von C157R ist fähig, diesen Phänotyp sowohl Δcdc42 als auch in Δrac1-Zellen zu komplementieren. **(B)** Phänotyp der verschiedenen Stämme AB31, AB31Δcdc42, AB31Δrac1 und der Deletionsstämmen, die die chimäre GTPase überexprimieren. Die Zellen wurden in Flüssigmedium unter induzierenden Bedingungen angezogen. Die Zellwände wurden mit "Calcofluor-White" angefärbt. Filamentöse Zellen zeigen Retraktionssepten am distalen Ende. Auch die Deletionsstämmen, die die chimäre GTPase überexprimieren sind fähig Retraktionssepten auszubilden. Allerdings wachsen die Filamente in den Komplementationsstämmen langsamer als im Wildtypstamm und stellen das Wachstum nach einer gewissen Zeit ein.

stellte sich die Frage, welchen Einfluss die C-terminale Region von Rac1 auf die *in vivo* Funktion von C157R hat. Rho-GTPasen enthalten ein C-terminal gelegenes CAAX-Motiv (Bourne et al., 1990). Dieses dient als Signal für die posttranslationale Modifikation der GTPase durch eine Prenylgruppe. Durch diese Modifikation werden die GTPasen in Membranen verankert. Darüber hinaus kann durch eine unterschiedliche Struktur der Prenylgruppen die Lokalisation von RhoGTPasen durch die Lipidzusammensetzung der sie umgebenden Membran reguliert werden (Ziman et al., 1993; Adamson et al., 1992a,b). Zusätzlich besitzen Rho-GTPasen eine C-terminale polybasische Region (PBR), die eine Assoziation mit den negativ geladenen Phosphatresten von Lipiden, insbesondere mit verschiedenen Phosphatidyl-Inositol-Phosphat Lipide erlaubt. Auch hierüber kann die intrazelluläre Lokalisation beeinflusst werden und die GTPase in bestimmten Membrandomänen angereichert werden (Jack et al., 2008; Ghomashchi et al., 1995; Adamson et al., 1992b; Prieto-Sanchez and Bustelo, 2003).

Es wurde untersucht, ob eventuell eine unterschiedliche Lokalisierung der beiden GTPasen Cdc42 und Rac1 einen Einfluss auf die unterschiedliche Funktion beider GTPasen in der Zelle hat. Dazu wurden die C-terminalen Regionen von Aminosäure 158 bis zum Ende der jeweiligen GTPase N-terminal an unterschiedliche fluoreszierende Proteine fusioniert und die Lokalisation Fluoreszenz mikroskopisch analysiert. In haploiden Zellen lokalisiert die C-terminalen Region von sowohl Cdc42 als auch Rac1 an der Plasmamembran und an den beiden Septen in der Teilungsebene. Neben der ähnlichen Lokalisation weisen die C-terminalen Regionen beider GTPasen allerdings auch eine unterschiedliche Lokalisation auf. Der C-Terminus von Cdc42 ist zusätzlich vermehrt an Endomembranen zu finden, während der C-Terminus von Rac1 an Punkten im Zytoplasma lokalisiert (siehe Abb. 2.21). Die C-terminalen Regionen von Cdc42 und Rac1 zeigen im Filament eine ähnliche Lokalisation wie in haploiden Zellen. Die Regionen beider GTPasen lokalisieren an der Plasmamembran. Zusätzlich ist das Cdc42-Fragment als eine starke Akkumulation am zukünftigen Septum angrenzend zur Vakuole zu finden, während das Rac1-Fragment an Punkten im Zytoplasma des Filaments lokalisiert.

Allerdings ist zu erwähnen, dass die Lokalisation einer GTPase nicht nur durch die C-terminale Lipidmodifikation und die polybasische Region bestimmt wird, sondern dass die Lokalisation auch durch die Interaktion mit anderen Proteinen reguliert werden kann. So besitzen die meisten RhoGEFs, Effektoren oder auch GAPs von RhoGTPasen lipidbindende Domänen (Erickson and Cerione, 2004; Rossman et al., 2005). Auf diese Weise können die regulatorischen Proteine gezielt an bestimmte Membrankompartimente rekrutiert werden und dort die Aktivität von RhoGTPasen stimulieren.

Viele Interaktionen zwischen regulatorischen Proteinen oder auch Effektoren erfolgen nicht über die C-terminale Region, sondern über die Effektorbindeschleife oder, wie im Fall von Hot1, über die N-terminale Region einer GTPase. Aus diesem Grund wurde zusätzlich die Lokalisation der Vollängen-Proteine von Cdc42 und Rac1 sowie Cdc42 und C157R miteinander verglichen (Abb. 2.22). Im Vergleich zu den C-terminalen Regionen beider GTPasen, zeigt sich hier eine etwas andere Lokalisation. Das Vollängen-Protein von Cdc42 ist weniger an der Plasmamembran, aber deutlich mehr an Endomembranen zu finden, als nur die C-terminale Region von Cdc42. Rac1 lokalisiert weiterhin überwiegend an der Plasmamembran, während die zytoplasmatischen Punkte der C-terminalen Region nicht länger zu beobachten sind. Wie auch die einzelnen C-

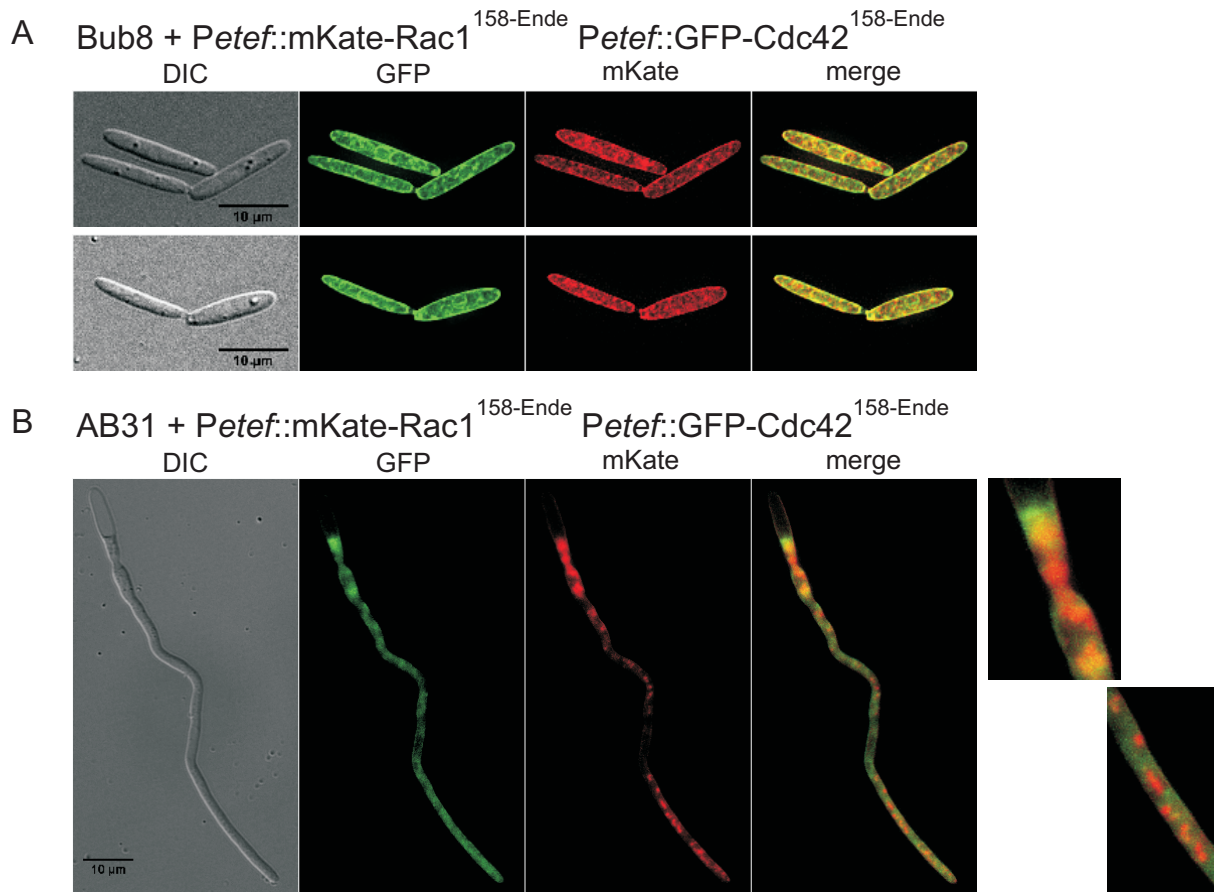


Abbildung 2.21: Die verschiedenen GTPase zeigen unterschiedliche intrazelluläre Lokalisationen ihrer C-terminalen Regionen.

Um zu überprüfen, ob die resultierende Komplementation der Deletionsphänotypen von *cdc42* und *rac1* durch C157R auf eine unterschiedliche Lokalisation der C-terminalen Regionen von Cdc42 und Rac1 zurückzuführen ist, wurden die C-terminalen Regionen der beiden GTPasen mit verschiedenen fluoreszierenden Proteinen N-terminal markiert und miteinander verglichen. **(A)** In einem Stamm, der die letzten 37 Aminosäuren von Cdc42 als N-terminales GFP-Fusionsprotein unter Kontrolle des *etef*-Promotors exprimiert, wurden die letzten 39 Aminosäuren von Rac1 als N-terminales mKate-Fusionsprotein ebenfalls unter Kontrolle des *etef*-Promotors exprimiert. Sowohl Cdc42 als auch Rac1 lokalisieren an der Plasmamembran. Während Cdc42 zusätzlich vermehrt an Endomembranen lokalisiert, findet man Rac1 zudem an Punkten im Zytoplasma. **(B)** Um die Lokalisation der C-terminalen Regionen im Filament zu vergleichen, wurde in einem AB31-Stamm, der die letzten 37 Aminosäuren von Cdc42 als N-terminales GFP-Fusionsprotein unter Kontrolle des *etef*-Promotors exprimiert, die letzten 39 Aminosäuren von Rac1 als N-terminales mKate-Fusionsprotein unter Kontrolle des *etef*-Promotors exprimiert. Die AB31-Stämme wurden für 7 Stunden in induzierendem Medium inkubiert und fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Es ist eine schwache Lokalisation beider GTPasen-Fragmente an der Plasmamembran zu erkennen. Während das Cdc42-Fragment als eine starke Akkumulation am zukünftigen Septum angrenzend zur Vakuole zu erkennen ist, lokalisiert das Rac1-Fragment an Punkten im Zytoplasma des Filaments.

terminalen Fragmente, sind beide GTPasen weiterhin an beiden Septen in der Teilungsebene lokalisiert (Abb. 2.22).

Die chimäre GTPase C157R ist im Vergleich zu Cdc42 deutlich mehr an der Plasmamembran zu finden. Dies ähnelt der Lokalisation von Rac1 (Abb. 2.22, (B)). C157R lokalisiert im Vergleich zu Cdc42 weniger stark an Endomembranen. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich die

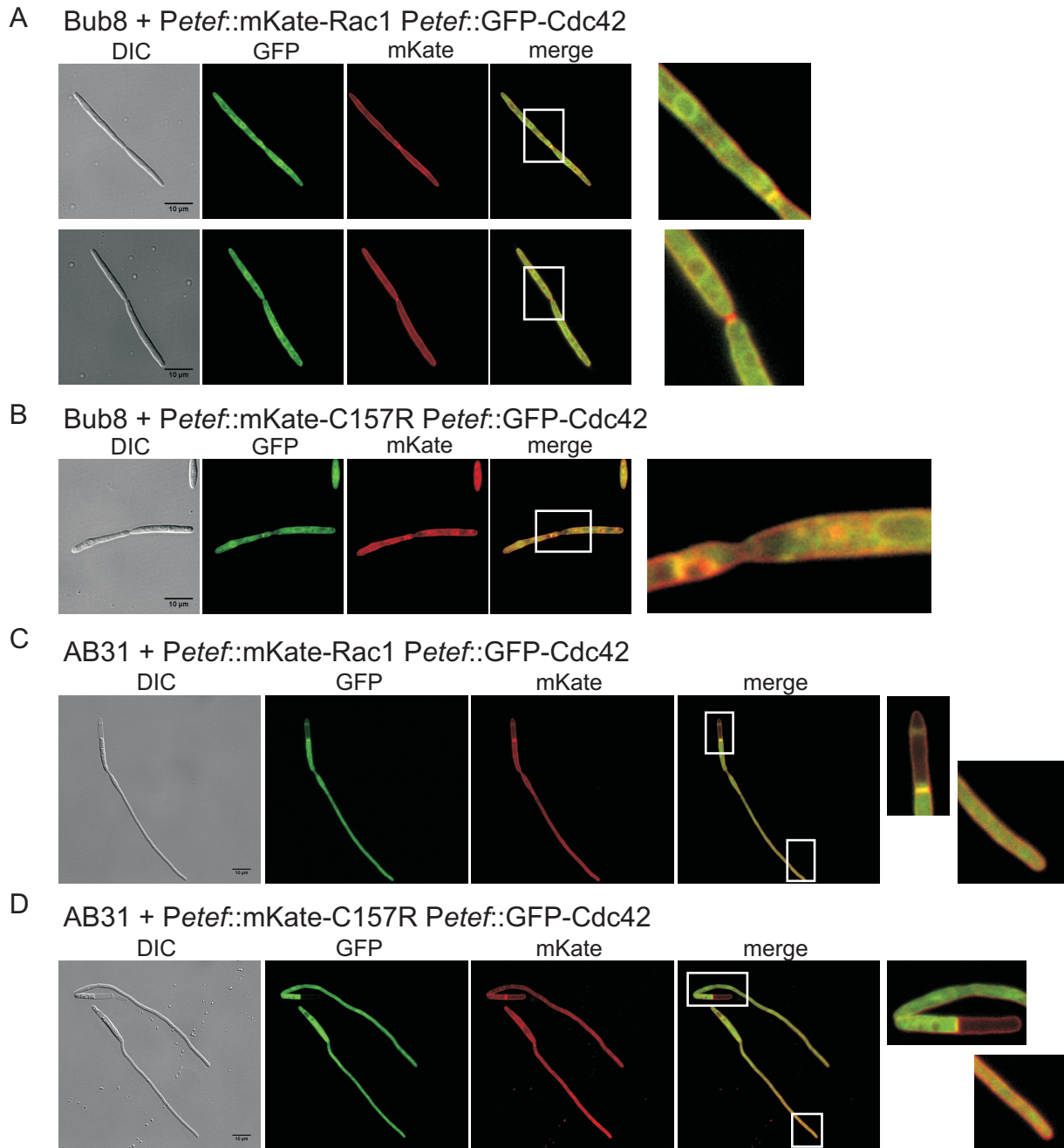


Abbildung 2.22: Die verschiedenen GTPase zeigen unterschiedliche intrazelluläre Lokalisationen.

Um zu überprüfen, ob die resultierende Komplementation der Deletionsphänotypen von *cdc42* und *rac1* durch C157R auf unterschiedliche Lokalisationen der Wildtyp-GTPasen zurückzuführen ist, wurden die einzelnen GTPasen mit verschiedenen fluoreszierenden Proteinen N-terminal markiert und miteinander verglichen. (A) In einem mKate-Rac1 exprimierenden Stamm wurde GFP-markiertes Cdc42 unter Kontrolle des *etef*-Promotors eingebracht. (B) Um die Lokalisation von Cdc42 mit C157R zu vergleichen wurde in einen mKate-C157R exprimierenden Stamm GFP-markiertes Cdc42 unter Kontrolle des *etef*-Promotors eingebracht. (C), (D) Um die Lokalisation in der filamentösen Zellen miteinander zu vergleichen wurde in einen mKate-C157R bzw. mKate-Rac1 exprimierenden AB31-Stamm GFP-markiertes Cdc42 unter Kontrolle des *etef*-Promotors eingebracht. Die AB31-Stämme wurden für 7 Stunden in induzierendem Medium inkubiert und fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Rac1 lokalisiert vermehrt an der Plasmamembran und an den Septen. Cdc42 ist an Endomembranen und an den Teilungssepten, aber weniger an der Plasmamembran zu finden. C157R, ist wie auch Rac1, vermehrt an der Plasmamembran zu finden und lokalisiert nur schwach an Endomembranen.

Lokalisationen von Cdc42 und C157R stark ähneln. Allerdings ist durch die auffallend starke Lokalisierung von C157R an der Plasmamembran auch eine Ähnlichkeit zur Rac1-Lokalisierung zu erkennen.

Auch im Filament lokalisieren Cdc42 und Rac1 unterschiedlich. Während Cdc42 im Zytoplasma zu finden ist, lokalisiert Rac1, ähnlich wie in haploiden Zellen, deutlich an der Plasmamembran. Die am distalen Ende des Filaments sich bildende Vakuole ist von Rac1, und nicht von Cdc42 umgeben. Abgegrenzt wird diese Vakuole von einem Septum, an dem beide GTPasen zu finden sind (Abb. 2.22, (C)).

Ein ähnliches Bild erhält man für die Kolokalisation der GTPasen Cdc42 und C157R im Filament. Während Cdc42 vermehrt im Zytoplasma lokalisiert, ist C157R, ähnlich wie Rac1, an der Plasmamembran zu finden. Wie Cdc42 und Rac1 lokalisiert C157R ebenfalls an dem sich bildenden Septum, welches die Vakuole am distalen Ende abgrenzt. Die teilweise unterschiedliche Lokalisation der C-terminalen Regionen der GTPasen und der Vollängen-Proteine zeigt, dass nicht nur die Lipidmodifikation und die polybasische Region wichtig für die Lokalisation einer GTPase sind. Scheinbar ist diese Lokalisation auch von Interaktion mit anderen Proteinen abhängig. Dennoch trägt der C-Terminus einer GTPase stark zur Lokalisation bei, denn die chimäre GTPase C157R zeigt eine im Vergleich zu Cdc42 deutlich veränderte Lokalisation. Diese unterschiedliche Lokalisation könnte ein möglicher Grund dafür sein, die chimäre GTPase C157R den Deletionsphänotyp von Rac1 komplementieren kann, dass aber zur Komplementation des Zelltrennungsdefekts einer  $\Delta cdc42$ -Mutante eine Überexpression von C157R benötigt wird. Anscheinend ist neben einer spezifischen Aktivierung ebenfalls die räumliche Organisation einer GTPase wichtig für ihre spezifische Funktion.

### 2.3.4 Die Rolle der Aminosäure an Position 56 für die Funktion der chimären GTPase C157R

Die Unterscheidung von Cdc42 und Rac1 durch die RhoGEFs Don1 und Cdc24 hängt von der Aminosäure an Position 56 ab. Es stellte sich die Frage, ob auch im Fall der durch die beiden RhoGEFs aktivierbaren chimären GTPase C157R dieser Selektionsmechanismus weiterhin eine Rolle spielt. Hierbei wurde sowohl die *in vitro* Aktivierbarkeit, als auch die *in vivo* Funktion dieser synthetischen GTPase C157R<sup>F56W</sup> getestet.

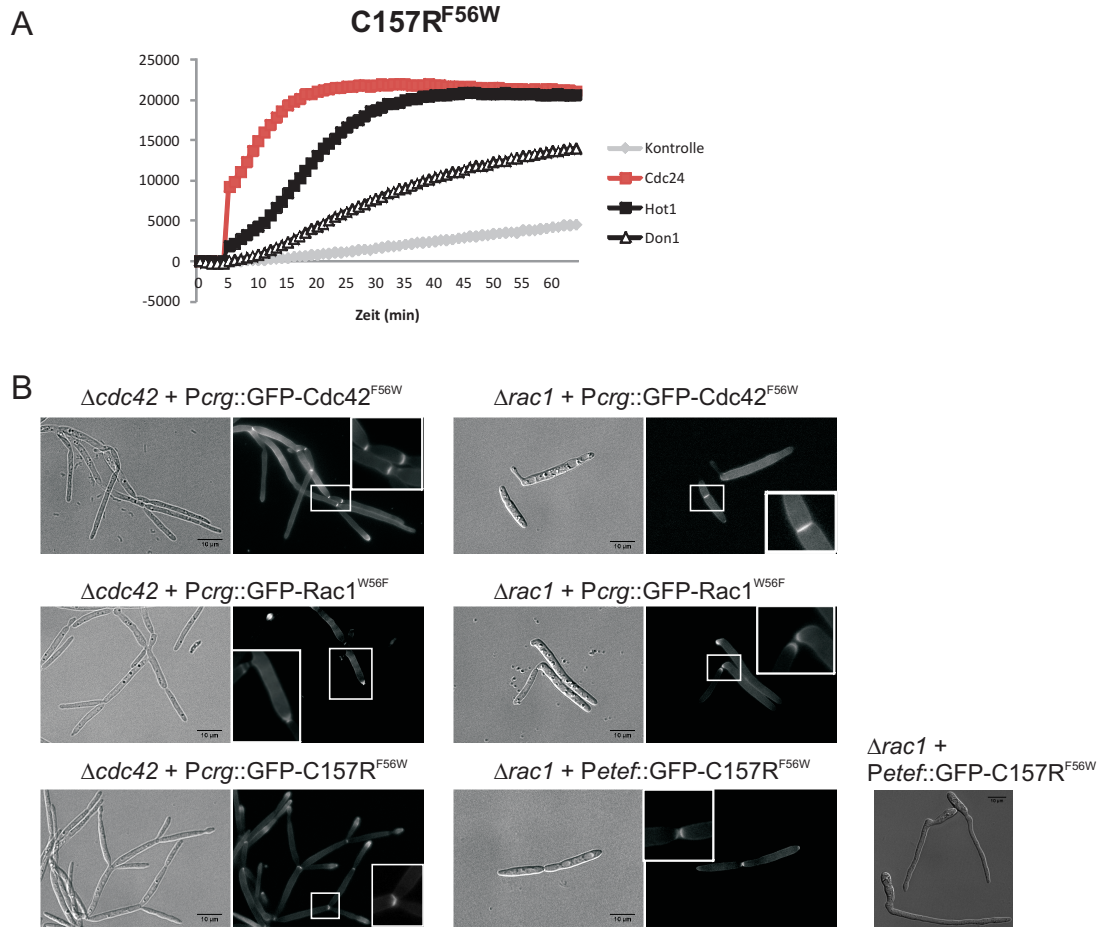
Abbildung 2.23 zeigt einen *in vitro* GEF-Assay, bei dem die Aktivierbarkeit der Punktmutante C157R<sup>F56W</sup> durch Cdc24 und Don1 getestet wurde. Als Kontrolle diente Hot1, dessen Spezifität durch die Aminosäure an Position 56 nicht betroffen ist.

Es ist zu beobachten, dass die Erkennung von C157R<sup>F56W</sup> weiterhin von der Aminosäure an Position 56 bestimmt wird. Während C157R von Don1 hoch effizient aktiviert wird, zeigt die Punktmutante C157R<sup>F56W</sup> eine deutlich reduzierte Aktivierung. Im Fall von Cdc24 kann die synthetische GTPase C157R<sup>F56W</sup>, im Vergleich zu C157R, effektiver aktiviert werden. Dies ist in Übereinstimmung mit früheren Arbeiten und mit den in Abbildung 2.9 gezeigten Daten. Hot1 ist erwartungsgemäß nicht von diesem Aminosäureaustausch betroffen.

Angesichts dieser Resultate stellte sich die Frage, ob die synthetische GTPase C157R<sup>F56W</sup> trotz der leicht abgeschwächten Aktivierbarkeit noch alle Funktionen der ursprünglichen GTPase



## 2 Ergebnisse



**Abbildung 2.23: Die Aktivierung der chimären GTPase C157R durch Hot1 ist unabhängig von der spezifitätsdeterminierenden Aminosäure Phe56.**

(A) In einem *in vitro* GEF-Assay wurde die Aktivierbarkeit einer Punktmutante der chimären GTPase C157R, C157R<sup>F56W</sup> durch die RhoGEFs Cdc24 und Don1 getestet. Als Kontrolle dient der RhoGEF Hot1, der von der Selektion durch F56W nicht betroffen ist. Während C157R von Don1 hoch effizient aktiviert wird, zeigt die Punktmutante C157R<sup>F56W</sup> eine deutlich reduzierte Aktivierung durch Don1. Cdc24 kann die synthetische GTPase C157R<sup>F56W</sup> im Vergleich zu C157R effektiver aktivieren. Hot1 ist nicht von diesem Aminosäureaustausch betroffen und kann C157R<sup>F56W</sup> wie auch C157R sehr effektiv aktivieren. Auf der y-Achse ist die relative Fluoreszenz aufgetragen. (B) Zusätzlich wurde die synthetische GTPase C157R<sup>F56W</sup> auf die Fähigkeit hin untersucht, Deletionsmutanten von *cdc42* und *rac1* zu komplementieren. Im Vergleich zu C157R ist C157R<sup>F56W</sup> nur in der Lage, den Zellmorphologiedefekt der *rac1*-Mutante zu retten, nicht aber den Zelltrennungsdefekt von  $\Delta cdc42$ . Eine Überexpression von C157R<sup>F56W</sup> führt zur Hyperpolarisation der Zelle und zu einem filamentösen Wachstum.

C157R übernehmen kann. Aus diesem Grund wurde die Funktion von C157R<sup>F56W</sup> *in vivo* getestet. Interessanterweise ist dieser Austausch ausreichend, um die Funktion von C157R nachhaltig zu stören. Während C157R die Deletionsphänotypen von sowohl *cdc42* als auch *rac1* komplementieren kann, verliert C157R<sup>F56W</sup> die Funktion den Zelltrennungsdefekt von *cdc42*-Deletionsmutanten zu komplementieren. Dies entspricht weitgehend der Wildtyp-Punktmutante Cdc42<sup>F56W</sup>, die den Cdc42-Phänotyp ebenfalls nicht komplementieren kann (siehe Abb. 2.23). Allerdings ist C157R<sup>F56W</sup> dazu in der Lage, eine Deletion von *rac1* vollständig zu komplementieren. Dies kann die korrespondierende GTPase Cdc42<sup>F56W</sup> nicht (siehe Abb. 2.23). Zwar

weisen  $\Delta rac1$ -Zellen, die Cdc42<sup>F56W</sup>-exprimieren, eine fast wildtypische Zellmorphologie auf, aber sie trennen sich weiterhin durch ein einzelnes zentrales Septum.

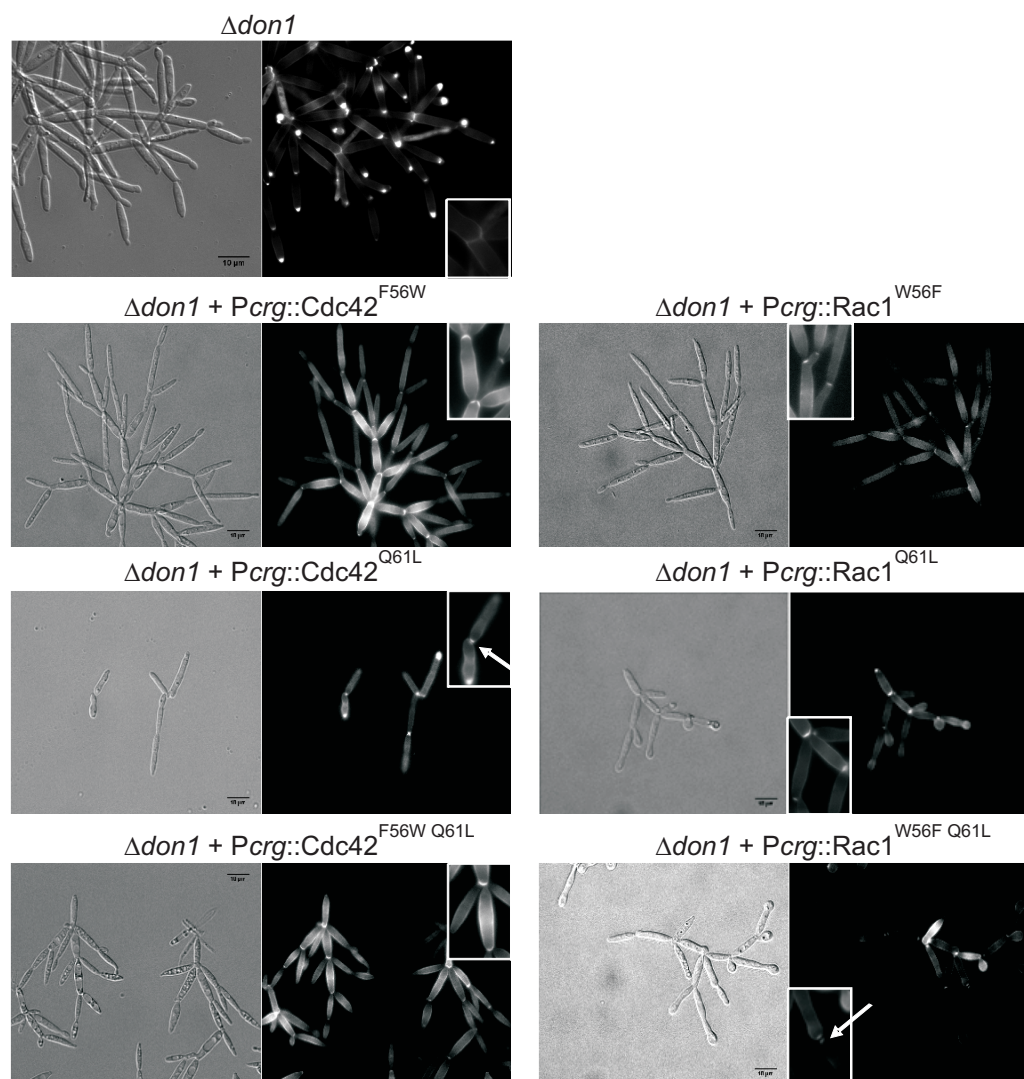
Auch eine Überexpression von C157R<sup>F56W</sup> in einer *rac1*-Deletionsmutante führt zu Ausbildung von Filamenten. Die Aktivierung von C157R und C157R<sup>F56W</sup> durch die verschiedenen RhoGEFs ist ähnlich effektiv. Daher sind die unterschiedlichen *in vivo* Effekte wahrscheinlich nicht auf die Aktivierung der GTPase, sondern vielmehr auf "nachgeschaltete"-Effekte zurückzuführen. Neben der Erkennung von spezifischen RhoGEFs, könnte diese Aminosäure auch für die Erkennung von spezifischen Effektoren eine wichtige Rolle spielen. Don1 kann die GTPase C157R<sup>F56W</sup> weiterhin aktivieren, allerdings weniger effizient. Diese Mutante kann aber nicht den Zelltrennungsdefekt von  $\Delta cdc42$  retten. Dies deutet darauf hin, dass potentielle Effektoren von Cdc42 für die Zytokinese von *U. maydis* auch mit Hilfe der Aminosäure an Position 56 zwischen Cdc42 und Rac1 unterscheiden. Diese Hypothese konnte im Folgenden durch weitere Experimente untermauert werden.

### 2.3.5 Die Signalspezifität von Cdc42 während der Zellteilung wird neben der GEF-GTPase Interaktion auch von der GTPase-Effektor Interaktion bestimmt

Sowohl die bisherigen *in vitro* als auch *in vivo* Daten deuten darauf hin, dass der Aminosäureaustausch zwischen Cdc42 und Rac1 an Position 56 nicht nur die Interaktion der GTPasen mit Don1 beeinflusst, sondern auch die Interaktion mit einem bisher noch unbekannten Effektor.

Diese Hypothese konnte durch weitere Experimente in Zusammenarbeit mit Kay Schink (vergleiche Doktorarbeit, Kay Schink) bestärkt werden. Der Zellteilungsdefekt von *don1*-Deletionsmutanten kann durch die Expression des konstitutiv aktiven Cdc42-Allels, Cdc42<sup>Q61L</sup>, supprimiert werden. Dagegen ist die Expression eines konstitutiv aktiven Rac1-Allels, Rac1<sup>Q61L</sup>, hierfür nicht ausreichend (siehe Abb. 2.24, (Mahlert et al., 2006)). Auch die Punktmutanten der beiden GTPasen, Cdc42<sup>F56W</sup> und Rac1<sup>W56F</sup>, können den Zytokinesedefekt von  $\Delta don1$ -Zellen nicht retten (Abb. 2.24). Da aber Rac1<sup>W56F</sup> zumindest teilweise den Zelltrennungsdefekt von  $\Delta cdc42$  komplementieren kann (vergleiche Abb. 2.23), wurde die konstitutiv aktive Variante dieser GTPase, Rac1<sup>W56F Q61L</sup>, in den *ip*-Lokus von  $\Delta don1$ -Zellen integriert. Diese konstitutiv aktive GTPase liegt immer in der GTP-gebundenen, aktiven Form vor, wird nicht durch den entsprechenden RhoGEF erkannt und ist daher unabhängig von der Aktivierung durch Don1. Deshalb ist es möglich, den Effekt von direkten Interaktionen mit Effektoren zu beobachten. Es fällt auf, dass die Expression dieses konstitutiv aktiven Rac1-Allels, Rac1<sup>W56F Q61L</sup>, zu einer partiellen Komplementation des Zellteilungsdefektes der  $\Delta don1$ -Muntante führt. Es ist die Bildung eines sekundären Septums zu beobachten (Abb. 2.24). Die komplementäre GTPase Cdc42<sup>F56W Q61L</sup> ist dazu nicht in der Lage. Diese Beobachtung unterstützt die Hypothese, dass es neben der spezifischen RhoGEF-GTPase Interaktion zwischen Don1 und Cdc42, auch eine spezifische Interaktion mit einem noch unbekannten Effektor geben muss. Da Rac1<sup>W56F Q61L</sup>, aber nicht Rac1<sup>Q61L</sup>, den *don1*-Deletionsphänotyp komplementieren kann, scheint dieser Effektor ebenfalls durch die Aminosäure an Position 56 zwischen Cdc42 und Rac1 zu unterscheiden.





**Abbildung 2.24: Der Aminosäureaustausch an Position 56 in Rac1 führt zu einem Wechsel der GTPase-Effektor-Interaktion**

Um zu überprüfen, ob der Aminosäureaustausch von Trp zu Phe in Rac1 an Position auch zu einem Wechsel der Effektorspezifität führt, wurde die konstitutiv aktive GTPase Rac1<sup>W56F Q61L</sup> in *don1* Deletionsmutanten überexprimiert. Zum Vergleich wurden zudem die GTPasen Cdc42<sup>F56W</sup>, Cdc42<sup>Q61L</sup>, Rac1<sup>W56F</sup>, Rac1<sup>Q61L</sup> und Cdc42<sup>F56W Q61L</sup> als Kontrolle ebenfalls in *don1* Deletionsmutanten überexprimiert. Die konstitutiv aktive Version von Cdc42, Cdc42<sup>Q61L</sup>, kann erwartungsgemäß den Deletionsphänotyp von *don1* komplementieren. Doch weder die Überexpression von Cdc42<sup>F56W</sup> noch von Rac1<sup>W56F</sup> kann den Zelltrennungsdefekt retten. Allerdings ist deutlich zu erkennen, dass die Expression von Rac1<sup>W56F Q61L</sup> in  $\Delta don1$ -Zellen, zur Induktion von regulären Doppelsepten führt.

## 3 Diskussion

### 3.1 Die Regulation der Zellmorphologie durch Hot1

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es sich bei Hot1 um einen ungewöhnlichen RhoGEF der Dbl-Familie handelt. RhoGEFs der Dbl-Familie besitzen ein charakteristisches Domänen-Motiv aus einer katalytischen DH-Domäne, die den Nukleotid-Austausch von GDP zu GTP katalysiert, und einer daran angrenzenden Membran-bindenden PH-Domäne. An Stelle dieser klassischen PH-Domäne besitzt Hot1 eine Membran-bindende BAR-Domäne. Hot1 ist ein nicht-essentieller RhoGEF und ist an der Regulation der Zellmorphologie und der Zellpolarität beteiligt. Es konnte gezeigt werden, dass Hot1 die kleine GTPase Cdc42 sowohl *in vitro* als auch *in vivo* aktiviert. Allerdings zeigt Hot1 ebenfalls eine schwache Aktivität gegenüber der nah verwandten GTPase Rac1 (dies wird im folgenden Abschnitt 3.2 näher diskutiert).

Es stellt sich die Frage, welche zelluläre Funktion der RhoGEF Hot1 während des Lebenszyklus von *U. maydis* spielt. Eine Deletion von Hot1 zeigt einen relativ milden Phänotyp. Es scheint allerdings eine Störung bei der Regulation der Zellform und des Knospungsmusters vorzuliegen. Im haploiden Zustand zeigen Wildtyp-Zellen eine ovale, gestreckte Zellform. Die Zelltrennung in haploiden *U. maydis*-Zellen findet durch die Ausbildung von zwei aufeinander folgenden Septen statt. Diese begrenzen eine Fragmentierungszone, an welcher die Tochterzelle von der Mutterzelle abgelöst wird (Weinzierl et al., 2002). Die Deletion von *hot1* führt zu einer veränderten Zellpolarität während des Knospungsprozesses. Es scheint, als bildet sich am gegenüberliegenden Zellpol bereits eine neue Knospe, bevor die Trennung von der ersten Knospe abgeschlossen ist. Dies wird als eine Einbuchtung an dem der ursprünglichen Knospe gegenüber liegenden Zellpol sichtbar (vergleiche Abb. 2.2). Normalerweise wird eine neue Knospe am gleichen Pol gebildet, wie die frühere Teilungsnarbe. Aus *S. cerevisiae* ist bekannt, dass nach der vollendeten Zelltrennung eine Cdc42-gesteuerte Repolarisation des Aktinzytoskeletts stattfindet. Hierbei werden Proteine als Polaritätsmarker benutzt, die an der alten Knospungsnarbe lokalisieren (Park and Bi, 2007; Tong et al., 2007). Das gleiche Prinzip liegt allem Anschein nach auch in *U. maydis* vor. Ein kritischer Faktor hierfür scheint die korrekte Bildung des zweiten Septums zu sein. Mutanten, in denen die Zelltrennung bzw. die Bildung des zweiten Septums gestört ist, wie z.B.  $\Delta cdc42$ - oder  $\Delta don1$ -Mutanten, knospen grundsätzlich unipolar (Weinzierl et al., 2002). Selbst nach multiplen Knospungen findet keine Reorientierung der Polarität statt. Der RhoGEF Gef1p aus *S. pombe* weist Ähnlichkeit zu Hot1 auf. Die DH-Domäne von Gef1p zeigt eine hohe Sequenzähnlichkeit zu Hot1 und kann ebenfalls als Cdc42-spezifischer RhoGEF fungieren. Deletionsmutanten von *gef1p* zeigen nur relativ schwache Phänotypen (Coll et al., 2003).  $\Delta gef1p$ -Zellen weisen eine unipolare Polarisation des Aktinzytoskeletts auf. Ähnlich wie  $\Delta hot1$ -Zellen, sind  $\Delta gef1p$ -Zellen verlängert und zeigen einen leicht verzögerten Zellzyklus. Zusätzlich wurde beschrieben, dass

$\Delta\text{gef1p}$ -Mutanten leichte Defekte bei der Bildung des Septums haben. Dieser Phänotyp stimmt zu großen Teilen mit dem beobachteten Phänotyp einer Deletion von *hot1* überein. Ein leichter Zellteilungsdefekt, zusammen mit einer unipolaren Polarisation des Aktinzytoskeletts, könnte erklären, warum Deletionsstämme von *hot1* bereits neue Knospen anlegen, bevor die letzte Zellteilung abgeschlossen ist und warum dies bevorzugt an dem, der alten Teilungsstelle, gegenüberliegenden Pol geschieht. Für Gef1p konnte gezeigt werden, dass dieses Protein die Bildung und die Kontraktion des Aktomyosinrings stimuliert (Coll et al., 2003, 2007).

Es stellt sich die Frage, ob Hot1 eine ähnliche Funktion in *U. maydis* übernimmt und der leichte Zellteilungsdefekt darauf zurückzuführen ist. Dafür spricht, dass Hot1 zusammen mit Septinen im Bereich des "*Mother-Bud-Neck*" lokalisiert. Allerdings erfolgt diese Lokalisation deutlich früher als der Aufbau des Zelltrennungsapparats. Daher erscheint es nicht wahrscheinlich, dass Hot1 eine direkte Rolle bei der Rekrutierung von Komponenten des Aktomyosinrings spielt.

Im Vergleich zu  $\Delta\text{don1}$ - oder  $\Delta\text{cdc42}$ -Mutanten zeigen  $\Delta\text{hot1}$ -Mutanten keinen Zelltrennungsdefekt, so dass eine direkte Rolle von Hot1 bei der Bildung des kontraktiven Aktomyosinrings und der Zelltrennung eher unwahrscheinlich erscheint. Es könnte sein, dass der Defekt in  $\Delta\text{hot1}$ -Mutanten nicht bei der Zelltrennung durch die Bildung des sekundären Septums auftritt, sondern dass die Bildung des primären Septums, das dem einzelnen Septum von *S. pombe* und *S. cerevisiae* entspricht verlangsamt abläuft. Dies wäre eine mögliche Erklärung für die beobachtete Lokalisierung am "*Mother-Bud-Neck*". Dagegen spricht, dass *cdc42*-Mutanten keinerlei Defekte bei der Bildung des primären Septums aufweisen. Es könnte allerdings sein, dass diese Funktion über die kleine GTPase Rac1 gesteuert wird, die von Hot1 ebenfalls schwach aktiviert werden kann (s.u.).

Es gibt eine weitere interessante Analogie zwischen der Funktion von Gef1p in *S. pombe* und der Zelltrennung von *U. maydis*. In *S. pombe* interagiert Gef1p mit dem BAR-Domänen Protein Hob3p, um das charakteristische Tandem-Motiv aus katalytischer DH-Domäne und einem Membran-Bindemodul zu generieren (Coll et al., 2007). Hob3p kann unabhängig von Gef1p an Cdc42p binden und die GTPase an die Teilungsebene rekrutieren. Zellen, in denen *hob3* deletiert wurde, zeigen Defekte in der Initiation der Kontraktion des Aktomyosinrings und der zeitlichen Regulierung der Septenbildung und Zelltrennung. Da der Arp2/3 Komplex in den gleichen Prozessen eine Aufgabe übernimmt, ist Hob3p, vermutlich im Komplex mit Gef1p und Cdc42p, an der Zytokinese über die Aktivierung der Arp2/3 Komplex-stimulierten Aktinpolymerisation beteiligt (Coll et al., 2007). Auch in *U. maydis* konnte ein Homolog zum BAR-Domänen Protein Hob3p aus *S. pombe* identifiziert werden. Ähnlich wie in *S. pombe*, kann auch Hot1 mit UmHob3 interagieren, allerdings interagiert UmHob3 nicht direkt mit dem RhoGEF, sondern kann vielmehr ein Heterodimer mit der BAR-Domäne von Hot1 bilden (vergleiche Abb.2.4). Es ist zu vermuten, dass diese Interaktion für die korrekte Funktion von Hot1 benötigt wird, da BAR-Domänen nur als Dimere in der Lage sind an Membranen zu binden (McMahon and Gallop, 2005; Peter et al., 2004). Interessanterweise kann UmHob3, ähnlich wie in *S. pombe*, auch in *U. maydis* mit Cdc42 interagieren. Es findet sich allerdings keine Interaktion der BAR-Domäne von Hot1 mit Cdc42, so dass Hob3p anscheinend unabhängig von Hot1 mit Cdc42 interagiert. UmHob3 scheint, ganz ähnlich wie in *S. pombe*, an der Zellteilung beteiligt zu sein. Die in  $\Delta\text{hob3}$ -Mutanten beobachtete verzögerte Zelltrennung könnte ebenfalls auf eine verlang-

samte Kontraktion des Aktomyosinrings bzw. auf eine fehlerhafte Rekrutierung von UmCdc42 durch UmHob3 hinweisen. Dies ist bisher allerdings nicht näher untersucht. Daher ist nicht klar, ob es auch in *U. maydis* einen Komplex aus Hot1, Hob3 und Cdc42 gibt. Die Zelltrennung in *U. maydis* und *S. pombe* weist einige Unterschiede auf, die eventuell die unterschiedlichen Funktionen der Proteine erklären können. Im Gegensatz zu *U. maydis* teilt sich *S. pombe* durch die Ausbildung eines einzelnen, zentralen Septums. Die Ausbildung des zweiten Septums in *U. maydis* ist abhängig von der Don1-gesteuerten Aktivierung durch Cdc42, daher ist die Beteiligung des potentiellen Komplexes aus Hot1, Hob3 und Cdc42 in diesem Zusammenhang nicht besonders wahrscheinlich.

Es könnte allerdings sein, dass der in *Umhob3*-Mutanten beobachtete Endozytosedefekt (s. u.) indirekte Auswirkungen auf die Zelltrennung hat. Während der Zelltrennung von *U. maydis* akkumulieren frühe Endosomen am primären Septum (Schink and Bölker, 2009). Diese Endosomen transportieren den Cdc42-spezifischen RhoGEF Don1, der wiederum die Bildung des zweiten Septums und damit die Zelltrennung reguliert. Ein Endozytosedefekt bzw. eine verlangsamte Endozytose würde dazu führen, dass insgesamt weniger Endosomen in der Zelle vorhanden sind, die im Bereich des sekundären Septums akkumulieren können. Damit würde hier weniger Don1 akkumulieren und die Bildung des zweiten Septums und damit auch die Zelltrennung verzögert ablaufen.

Don1 scheint der bedeutendere RhoGEF während der Zellteilung zu sein und *cdc42*-Mutanten zeigen einen sehr ähnlichen Zelltrennungsdefekt wie Don1. Jedoch übernimmt Cdc42 anscheinend noch weitere Funktionen, die von Hot1 reguliert werden könnten. Während  $\Delta don1$ -Mutanten die gleiche Zellform wie Wildtyp-Zellen aufweisen, die sich lediglich nicht mehr voneinander lösen können, führt die Deletion von *cdc42* zu einem deutlich veränderten Phänotyp.  $\Delta cdc42$ -Mutanten sind lang gestreckt und zeigen oftmals Krümmungen und Ausbuchtungen, die auf Defekte beim Zellwandaufbau oder auf Polaritätsdefekte hindeuten können (siehe Einleitung). Interessanterweise zeigt eine Doppelmutante von *hot1* und *don1* nahezu den gleichen Phänotyp wie die *cdc42*-Deletion (nicht gezeigt). Daher ist es wahrscheinlich, dass Hot1 und Don1 während des Wachstums von *U. maydis* verschiedene Cdc42-abhängige Prozesse koordinieren. Während Don1 hauptsächlich die Cdc42-gesteuerte Bildung des sekundären Septums reguliert, könnte Hot1 an der Regulation der Zellmorphologie durch Cdc42 beteiligt sein.

#### 3.1.1 BAR-Domänen als Membran-bindende und Membran-formende Protein-Komponenten

Alle bisher diskutierten Funktionen von Hot1 und den homologen Proteinen aus anderen Organismen sind an zellulären Prozessen beteiligt, die entweder in Assoziation mit Membranen stattfinden oder die an der Reorganisation von Membranen beteiligt sind. Da RhoGTPasen eine C-terminale Lipidmodifikation besitzen, müssen ihre Aktivierung und die von ihnen regulierten Prozesse ebenfalls im Bereich von Membranen stattfinden. Daher ist es auch für die regulatorischen Proteine dieser GTPasen von entscheidender Bedeutung, dass sie an Membranen lokalisieren. Während die meisten RhoGEFs der Dbl-Familie durch PH-Domänen an die Plasmamembran rekrutiert werden, besitzen Hot1 und die verwandten Proteinen TUBA und Gef1p

eine Membran-bindende BAR-Domäne. Ein entscheidender Unterschied der BAR-Domänen zu PH-Domänen ist, dass BAR-Domänen keine spezifischen Phosphoinositol-Phosphatidyl-Lipide erkennen, sondern in erster Linie die Krümmung der Membran als physikalische Eigenschaft wahrnehmen.

Obwohl BAR-Domänen nicht spezifisch an bestimmte Lipide binden (Peter et al., 2004), konnte gezeigt werden, dass viele BAR-Domänen-Proteine dennoch eine Präferenz zu Membranen mit einer bestimmten Phosphoinositol-Phosphatidyl-Lipid-Komposition haben. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass bestimmte Lipide durch eine unterschiedliche Anzahl von Phosphatresten und die damit verbundene unterschiedliche Größe der Kopfgruppe eine bestimmte Membrankrümmung begünstigen. Darüber hinaus kann auch die Ladung dieser Lipide eine wichtige Rolle spielen, da die eigentliche Membranbindung der BAR-Domänen in erster Linie über elektrostatische Wechselwirkungen stattfindet (Peter et al., 2004). Dies führt zur selektiven Rekrutierung von BAR-Domänen-Proteinen an Membrankompartimente mit einer spezifischen Lipidzusammensetzung. Es konnte gezeigt werden, dass TUBA vorzugsweise an PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-reichen Vesikeln lokalisiert (Kovacs et al., 2006). Hierbei ist allerdings bisher nicht vollkommen geklärt, ob die BAR-Domäne von TUBA spezifisch an diese Lipide bindet oder ob PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> die Bildung von bestimmten Membrankrümmungen begünstigt. Diese Lokalisation an PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-reiche Membranen dient wahrscheinlich dazu, die Aktivität von TUBA auf bestimmte zelluläre Subregionen zu beschränken. Eine Überexpression von TUBA führt zu sogenannten dorsalen "*membrane ruffles*". Dies sind stark gewellte Membranstrukturen, die durch eine Reorganisation des Aktinzytoskeletts hervorgerufen werden (Kovacs et al., 2006). Es wird vermutet, dass TUBA diese Ausstülpungen der Membran durch die direkte Interaktion mit Aktin-regulierenden Proteinen (wie z.B. N-WASP) und durch die Rekrutierung von Signalmodulen an gezielten Orten in der Zelle fördert. Da es zu diesen Membranstrukturen in pilzlichen Zellen kein direktes Analog gibt, ist nicht klar, inwieweit sich die Funktionen von TUBA und Hot1 in diesem Punkt ähneln. Allerdings konnte gezeigt werden, dass TUBA auch eine Rolle bei der Clathrin-vermittelten Endozytose spielt, und hierbei ergeben sich überraschende Parallelen zwischen TUBA und Hot1. Es konnte gezeigt werden, dass TUBA an sogenannten Clathrin-umhüllten Vesikeln ("*clathrin-coated pits*") lokalisiert. Hier reguliert TUBA wahrscheinlich die Abschnürung von endozytotischen Vesikeln durch die Rekrutierung von Dynamin. Dies ist ein kritischer Schritt, denn die Inhibierung oder Deletion von Dynamin führt zu einem starken Endozytose-Defekt und interessanterweise auch zu einer starken Akkumulation von TUBA an "*clathrin-coated pits*" (Shen et al., 2011).

Es wurde beschrieben, dass PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> insbesondere im sogenannten "*neck*" von sich formenden endozytotischen Vesikeln akkumuliert (Antonescu et al., 2011). Dieses wird unter anderem von Dynamin erkannt, welches an der Abschnürung der Vesikel beteiligt ist (Haucke, 2005). Außerdem haben diese "*necks*" eine starke Krümmung, an denen bevorzugt BAR-Domänen Proteine lokalisieren (vergleiche Abb. 3.1). Interessanterweise zeigt Hot1 hierbei eine ähnliche Lokalisation wie TUBA. Hot1 lokalisiert an Strukturen direkt unter der Plasmamembran, die partiell mit Aktin "*patches*" kolokalisieren. Diese Aktinstrukturen sind in Pilzen Orte früher Endozytose, an denen Clathrin-umhüllte Vesikel gebildet und abgeschnürt werden (Kaksonen et al., 2005, 2006; Moseley and Goode, 2006). Die Lokalisation von Hot1 an diesen Strukturen könnte somit auf

eine ähnliche Funktion wie TUBA hindeuten.

Neben Hot1 befinden sich auch die anderen, in dieser Arbeit untersuchten, BAR-Domänen-Proteine an diesen Strukturen. In *S. cerevisiae* wurde beschrieben, dass die BAR-Domänen Proteine Rvs161p und Rvs167p, die Homologe der BAR-Domänen Proteine Hob1p und Hob3p, auch an der frühen Endozytose beteiligt sind (Smaczynska-de Rooij et al., 2012). Rvs161p ist als Heterodimer mit Rvs167p in Endozytose, dem Vesikeltransport, der Regulation von F-Aktin sowie der Zellpolarität beteiligt. Sie lokalisieren an dem bereits beschriebenen "neck" von sich formenden Clathrin-umhüllten endozytotischen Vesikeln, stabilisieren diese und ermöglichen die finale Abschnürung durch das Dynamin-Homolog Vps1 (Smaczynska-de Rooij et al., 2012).

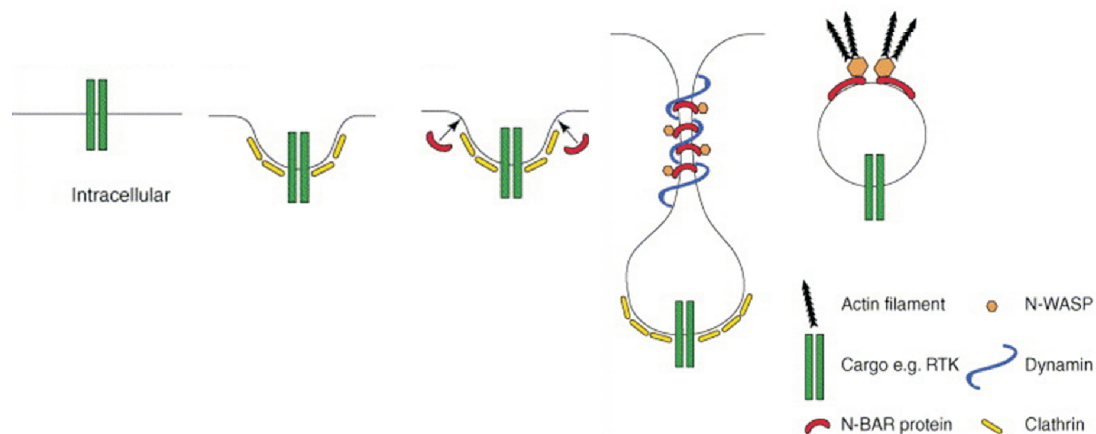


Abbildung 3.1: **Modell der möglichen Funktion von N-BAR-Domänen-Proteinen bei der Clathrin-vermittelten Endozytose. modifiziert nach (Dawson et al., 2006).**

Dargestellt ist ein mögliches Modell der Funktion der N-BAR-Domänen-Proteine bei der Clathrin-vermittelten Endozytose. N-BAR-Domänen werden vermutlich durch die Wahrnehmung von definierten Membrankrümmungen an die Stelle der Clathrin-vermittelten Endozytose rekrutiert. Dort können N-BAR-Domänen durch die Insertion der N-terminalen amphipathischen Helix weitere Membrankrümmungen induzieren, wobei die konkave Oberfläche der Domäne als Gerüst für eine definierte Membrankrümmung dient. Diese Induktion rekrutiert weiter endozytotische Proteine, um die Vesikelabschnürung durch die GTPase Dynamin und die Aktivierung der Aktinpolymerisation durch den Arp2/3 Komplex zu ermöglichen.

Auch in *U. maydis* hat zumindest UmHob3 einen starken Einfluss auf die Endozytose. *hob3*-Deletionsmutanten zeigen eine stark verringerte Aufnahme des Endozytosemarkers FM4-64. Dies stimmt mit einer Funktion bei den sehr frühen Stadien der Endozytose überein. Darüber hinaus lokalisiert UmHob3 an Vesikel direkt unter der Oberfläche. Diese Lokalisation korrespondiert mit der Lokalisation von Rvs161p und Rvs167p in *S. cerevisiae* (Kukulski et al., 2012). Ebenso ist UmHob1 an solchen vesikulären Strukturen zu finden. Es ist daher anzunehmen, dass UmHob1 und UmHob3, analog zur Situation in *S. cerevisiae*, zusammen an sich formenden endozytotischen Vesikeln lokalisieren. Diese Annahme wird auch von der Beobachtung unterstützt, dass UmHob3 und UmHob1 dimerisieren können. Allerdings hat UmHob1, ähnlich wie SpHob1, keinen deutlichen Phänotyp, weder bei der Zelltrennung noch bei der Endozytose. Es stellt sich die Frage, warum nur die Deletion von UmHob3, nicht aber der anderen BAR-Domänen-Proteine,

einen solch drastischen Phänotyp auslöst. Da zumindest rekombinant hergestelltes UmHob3 nur Heterodimere, aber keine Homodimere bildet, wäre zu vermuten, dass die Deletion von jeder der beiden beteiligten Dimerisierungspartner einen ähnlichen Phänotyp hervorruft. Hieraus kann man schließen, dass UmHob3 anscheinend die kritische Komponente im Komplex der verschiedenen BAR-Domänen-Proteine ist, während UmHob1 und UmHot1 ersetzt werden können. In einer Genomanalyse wurden noch zwei weitere BAR-Domänen-Proteine (Um03539, Um11702) identifiziert, die womöglich redundante Funktionen übernehmen können. Eine weitere Möglichkeit liegt eventuell im molekularen Aufbau der beteiligten Proteine begründet. BAR-Domänen-Dimere zeigen eine "bananen-förmige" Struktur mit einer positiv geladenen Oberfläche (Peter et al., 2004). Diese konkave Krümmung entsteht durch das Überkreuzen der einzelnen Monomere. Der Dimerisierungswinkel variiert zwischen verschiedenen Mitglieder und trägt somit zu einem spezifischen Krümmungsgrad zwischen verschiedenen Dimeren bei (Frost et al., 2008). Neben der Homodimerisierung können viele dieser Proteine auch Heterodimere zwischen nah verwandten Mitgliedern ausbilden, wie es auch in *U. maydis* der Fall ist. Hier bildet UmHob3 einen Heterodimer mit UmHot1 und UmHob1 aus. So könnten durch Heterodimerisierung andere Signalwege erreicht werden, als es bei einer Homodimerisierung der Fall wäre.

Einige BAR-Domänen Proteine besitzen zusätzlich eine N-terminale amphipathische Helix (N-BAR). Zu diesen gehören auch die Proteine SpHob1 und SpHob3 sowie Rvs161 und Rvs167. Diese amphipathische Helix besteht aus einer  $\alpha$ -Helix, von der eine Seite polar oder positiv geladen ist und die andere Seite hydrophob ist. N-BAR Proteine können mittels Insertion der N-terminalen amphipathischen Helix in eine Membran spezifisch sehr starke Membrankrümmungen induzieren und diese anschließend mit Hilfe ihrer bananen-förmigen Oberfläche stabilisieren (Peter et al., 2004; Zimmerberg and McLaughlin, 2004; Blood and Voth, 2006). Diese N-terminale Helix konnte auch in Hot1, Hob1 und Hob3 nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.2).

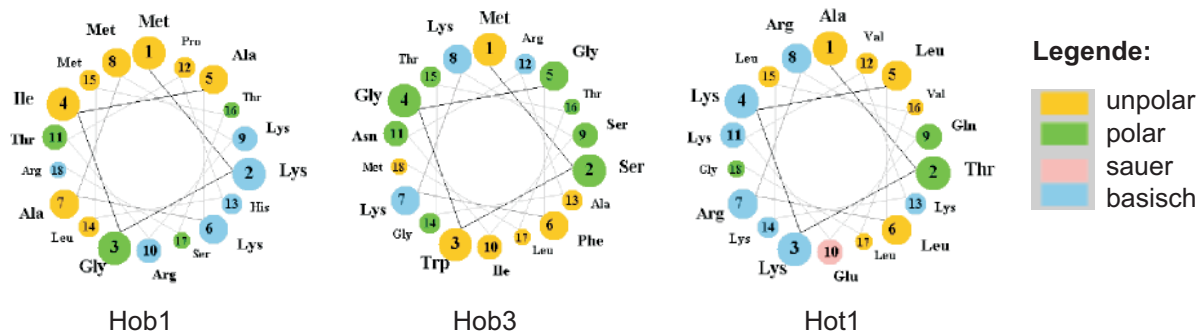


Abbildung 3.2: **Prognose einer N-terminalen amphipathischen Helix für Hob1, Hob3 und Hot1.**

Mit Hilfe der Helix Wheel Software der Universität Virginia (<http://cti.itc.virginia.edu/cm/g/Demo/wheel/wheelApp.html>) konnten die axialen Projektionen des N-Terminus von Hob1, Hob3 und Hot1 erstellt werden. In allen drei Fällen handelt es sich um N-BAR-Domänen Proteine, die am N-Terminus eine amphipathische Helix besitzen.

In Abbildung 3.2 repräsentieren die gelb markierten Aminosäuren unpolare Aminosäuren, während die grünen und blauen polare bzw. basische Aminosäuren darstellen. Es ergibt sich

das Bild einer, für N-BAR-Domänen charakteristischen amphipathischen Helix, die auf einer Seite unpolar und auf der anderen Seite polar bzw. positiv geladen ist. Durch diese Eigenschaft sind vermutlich auch diese drei BAR-Domänen aus *U. maydis* dazu in der Lage Membrankrümmungen zu induzieren. Allerdings wurde diese Eigenschaft *in vivo* noch nicht weiter untersucht. Durch die verschiedenen Heterodimerisierungen der BAR-Domänen-Proteine können spezifische Krümmungswinkel generiert werden, so dass durch die einzelnen Dimere jeweils ganz spezifische Membrankrümmungen erkannt und vermutlich auch induziert werden können. Scheinbar ist UmHob3 für die Generierung oder Erkennung einer ganz bestimmten Membrankrümmung notwendig, die durch die anderen BAR-Domänen-Protein in den verschiedenen Komplexen nicht ersetzt werden kann.

Es zeigt sich, dass viele scheinbar separate Prozesse wie z.B. Endozytose, die Regulation des Aktinzytoskeletts und die Zellteilung eng miteinander verknüpft sein können und dass oftmals kleine GTPasen und ihre Regulatoren bei diesen Prozessen eine Schlüsselposition als molekulare Schalter einnehmen. In all diesen Prozessen stellt sich immer die Frage, wie sichergestellt wird, dass nur ein spezifischer biologischer Prozess aktiviert wird, zumal es in der Zelle eine Vielzahl von sehr ähnlichen molekularen Schaltern mit teilweise überlappenden Funktionen gibt. Im Folgenden wurde daher versucht, zu verstehen, mit welchen Mechanismen eine Zelle zwischen verschiedenen molekularen Schaltern unterscheiden kann und nur einen bestimmten Signalweg spezifisch aktivieren kann.

## 3.2 Der RhoGEF Hot1 benutzt einen neuen Mechanismus zur Erkennung von Cdc42 und Rac1

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es sich bei Hot1 und dem humanen Homolog TUBA, um Cdc42-spezifischen RhoGEFs der Dbl-Familie handelt, die auch eine geringe Aktivität gegenüber der nah verwandten GTPase Rac1 zeigen. Kleine GTPasen weisen eine hohe Sequenzähnlichkeit untereinander auf. Dieses führt zu der Frage, wie ein RhoGEF zwischen verwandten GTPasen unterscheiden kann. Signalspezifität von Signalkaskaden wird durch selektive Interaktionen zwischen RhoGEFs und ihren Substraten, den GTPasen, erreicht. Mit Hilfe von Kristallstrukturen von humanen RhoGEFs der Dbl-Familie in Komplex mit den jeweiligen humanen GTPasen konnten bestimmte Aminosäuren identifiziert werden, die für die Erkennung einer GTPase durch RhoGEFs kritisch sind. Kristallstrukturen zeigten, dass es sich bei der katalytischen DH-Domäne der RhoGEFs der Dbl-Familie um ein elongiertes Bündel aus  $\alpha$ -Helices handelt. Zwar weisen DH-Domänen verschiedener RhoGEFs Sequenzvariabilität auf, zeigen jedoch eine hohe strukturelle Ähnlichkeit. DH-Domänen besitzen drei konservierte Regionen (CR1-CR3), welche die zentrale Region der Domäne bilden (Liu et al., 1998). Die CR1- und CR3- Region formen eine Art "Bindetasche" oder eine Interaktionsfläche, die Interaktionen mit bestimmten Regionen der GTPase erlaubt. Bei diesen Regionen der GTPase handelt es sich um ein antiparalleles  $\beta$ -Faltblatt, welches als Effektorbindeschleife bekannt ist (siehe Einleitung). RhoGEFs interagieren mit ihren jeweiligen Substraten nach einer Art "Schlüssel-Schloss"-Prinzip.



Spezifische Seitenketten innerhalb der konservierten Region CR3 des RhoGEFs erkennen dabei spezifische Aminosäuren der GTPase und gehen Interaktionen mit diesen ein (vergleiche Abb. 3.3). Eine einzelne konservierte Aminosäure innerhalb der Effektorbindeschleife von Cdc42 und Rac1 wurde in der Literatur als kritische Interaktionsstelle für die Spezifitätsdetermination zwischen RhoGEF und GTPase beschrieben (Karnoub et al., 2001; Gao et al., 2001; Snyder et al., 2002). Diese Aminosäure liegt an Position 56 der GTPasen und ist in Cdc42-Proteinen ein Phenylalanin und in Rac1-Proteinen ein Tryptophan. Da das Phenylalanin an Position 56 von Cdc42 kleiner ist, als das Tryptophan von Rac1, ist die Bindetasche der Cdc42-spezifischen RhoGEFs kleiner, als die der Rac1-spezifischen RhoGEFs. Dadurch passt nur das Phenylalanin von Cdc42 in die Bindetasche der Cdc42-spezifischen RhoGEFs, während das Tryptophan von Rac1 sterisch zu sperrig ist. Aufgrund der größeren Bindetasche von Rac1-spezifischen RhoGEFs ist es möglich, dass das Phenylalanin von Cdc42 auch in die Bindetasche der Rac1-spezifischen RhoGEFs passt. Dies ist eine Erklärung, warum zum Beispiel der RhoGEF Cdc24 in *U. maydis* auch eine geringe Aktivität gegenüber Cdc42 zeigt. Es gibt aus dem menschlichen System weitere RhoGEFs, die neben Rac1 auch Cdc42 aktivieren können, zum Beispiel Vav und Vav2 (Snyder et al., 2002). Dennoch gibt es gleichermaßen rein Rac1-spezifische RhoGEFs. Diese reine Rac1-Spezifität wird über bestimmte Wasserstoffbrückenbindungen gewährleistet, die an der Interaktionsfläche zwischen dem RhoGEF und der GTPase entstehen (siehe Abb. 3.3); (Snyder et al., 2002).

Daraus ergibt sich allerdings die Frage, wie ein Cdc42-spezifischer RhoGEF wie Hot1 dennoch Rac1 erkennen kann, obwohl das sperrige Tryptophan von Rac1 die Cdc42-spezifischen RhoGEFs ausschließt. Im Zuge dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sowohl Hot1 als auch TUBA die bisher als spezifitätsbestimmend beschriebene Aminosäure an Position 56 der GTPasen nicht benutzen, um zwischen Cdc42 und Rac1 zu unterscheiden (vergleiche Abb. 2.9 und Abb. 2.14). Neben bestimmten Kriterien auf Seiten der GTPase, die eine spezifische Erkennung sicherstellen, gibt es auch auf Seiten der RhoGEFs bestimmte Merkmale für eine Spezifitätsdetermination. Durch Kristallstrukturen und verschiedene Mutationsversuche wurden in humanen RhoGEFs Aminosäuren identifiziert, die für die Interaktion zwischen GTPase und RhoGEF notwendig sind (Snyder et al., 2002; Rossman et al., 2002a,b). Analog zur Aminosäure an Position 56 der GTPasen Cdc42 und Rac1 gibt es auch auf Seite der RhoGEFs Aminosäuren, die für die spezifische Erkennung von Cdc42 und Rac1 wichtig sind. So wird die kritische Aminosäure an Position 56 innerhalb der GTPase durch eine spezifische Seitenkette in der konservierten Region CR3 der RhoGEFs erkannt (Abb. 3.3). Das Tryptophan(56) in Rac1 wird auf der Seite der Rac1-spezifischen RhoGEFs durch ein konserviertes Isoleucin erkannt, welches mit dem Tryptophan interagieren kann (Abb. 3.3), (Snyder et al., 2002). Cdc42-spezifische RhoGEFs enthalten an der korrespondierenden Position hingegen ein konserviertes Leucin, welches wiederum mit dem Phenylalanin in Cdc42 Interaktionen eingeht (Abb. 3.3), (Snyder et al., 2002). Da das Leucin in Cdc42-spezifischen RhoGEF größer ist als das Isoleucin in Rac1-spezifischen RhoGEFs, kommt es zu einer sterischen Kollision zwischen dem Leucin der Cdc42-spezifischen RhoGEFs und dem Tryptophan von Rac1, wodurch die Aktivierung von Rac1 blockiert wird. Cdc42-spezifische RhoGEFs selektionieren demnach auf Aminosäuren mit kleinen Seitenketten an dieser Position der GTPase (Snyder et al., 2002).

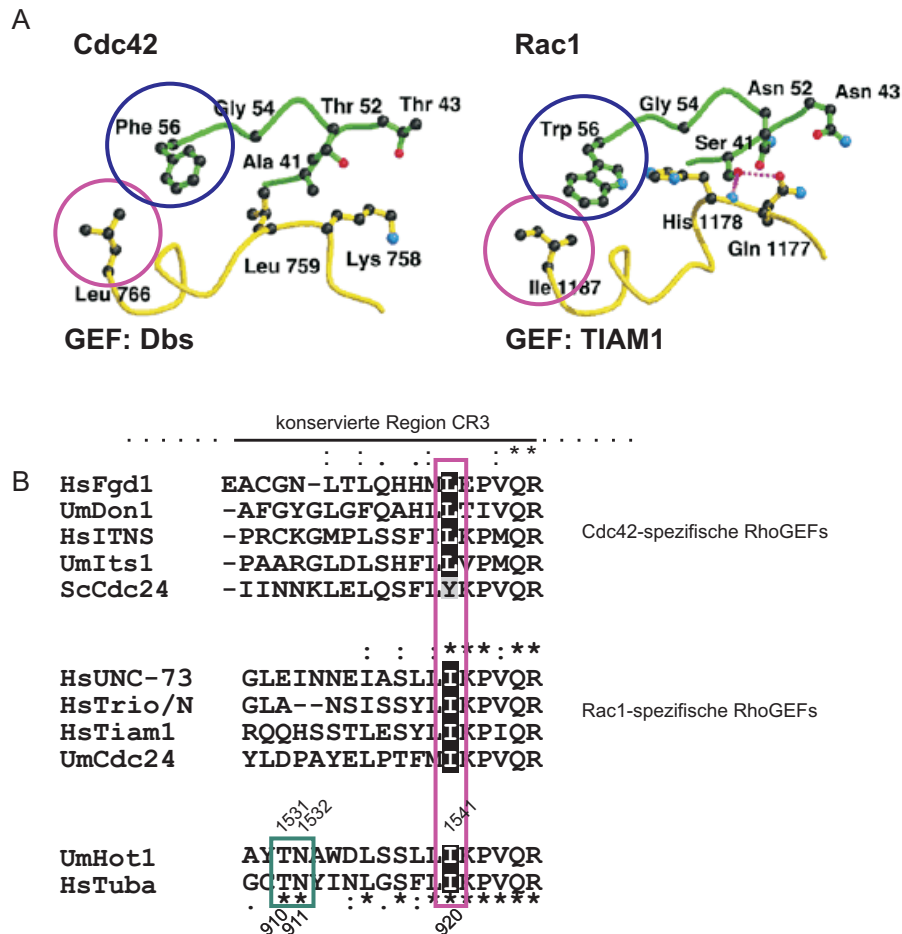


Abbildung 3.3: Strukturelle Grundlage der spezifischen Erkennung von Cdc42 und Rac1 durch verschiedene RhoGEFs, modifiziert nach (Snyder et al., 2002).

(A) RhoGEFs unterscheiden zwischen Cdc42 und Rac1 mit Hilfe von bestimmten Aminosäuren. Ein strukturell sehr konserviertes Motiv auf Seite der GTPase ist die Aminosäure an Position 56. So besitzen alle bekannten Cdc42-Proteine ein Phenylalanin, während alle bekannten Rac1-Proteine ein Tryptophan an dieser Position enthalten. Die Erkennung erfolgt auf Seiten der RhoGEFs durch eine bestimmte  $\alpha$ -Helix, deren spezifische Seitengruppen eine spezifische Interaktionen mit der konservierten Aminosäure an Position 56 der GTPase eingehen. Diese Erkennung funktioniert nach einer Art "Schlüssel-Schloss-Prinzip". Cdc42-spezifische RhoGEFs enthalten häufig an der entscheidenden Position ein Leucin, welches den Kontakt mit dem Phenylalanin von Cdc42 ermöglicht und gleichzeitig zu einer sterischen Kollision mit dem Tryptophan von Rac1 führt. Die Rac1-spezifischen RhoGEFs enthalten hingegen ein Isoleucin, was die sterische Kollision nicht aufweist. Modifiziert nach (Snyder et al., 2002). (B) Sequenzvergleich der konservierten Region CR3 verschiedenerer RhoGEFs, die wichtig ist für die Diskriminierung zwischen Cdc42 und Rac1. Cdc42-spezifische RhoGEFs enthalten an der kritischen Position ein Leucin, während Rac1-spezifische RhoGEFs ein Isoleucin besitzen. Interessanterweise, tragen Hot1 und TUBA, trotz ihrer Cdc42-Spezifität, ein Rac1-charakteristisches Isoleucin an besagter Position. Potentielle Kandidaten in Hot1 und TUBA, die eine geeignete Interaktion mit dem Lysin an Position 27 in Cdc42 eingehen könnten, sind die konservierten Aminosäuren Threonin und Glutamat [Hot1 (Position 1531/1532) und TUBA (Position 910/911)].

Vergleicht man nun die Aminosäuresequenzen von Hot1 und TUBA mit anderen RhoGEFs, fällt auf, dass Hot1 und TUBA an dieser Position, anstelle des für Cdc42-spezifische RhoGEFs

charakteristischen Leucins, ein Isoleucin tragen (siehe Abb. 3.3). Dies stellt eine mögliche Erklärung dar, warum sowohl Hot1 als auch TUBA das bisher charakteristische Phenylalanin an Position 56 in Cdc42 nicht benutzen, um zwischen Cdc42 und Rac1 zu unterscheiden. Tatsächlich sind bei der GEF-GTPase Interaktion vermutlich auch noch weitere Interaktionsstellen von Bedeutung, da für den RhoGEF Dbl gezeigt wurde, dass dieser zwischen den GTPasen RhoA und Rac1 diskriminieren kann, obwohl beide an Position 56 ein Tryptophan besitzen (Snyder et al., 2002). Die geladenen Aminosäuren Arginin (5), Asparagin (45) und Glutamin(54) aus RhoA fehlen in Cdc42 und Rac1. RhoA-spezifische RhoGEFs besitzen ein konserviertes Lysin, welches einen positiv geladenen Selektionsmechanismus zwischen Rac1 und RhoA ermöglicht. Strukturelle Studien zeigen weiterhin, dass ausgedehnte Kontakte zwischen RhoGEFs und der SwitchII-Region (Aminosäure 57-75 von Cdc42) eine selektive Bindung bewirken (Rossman et al., 2005). Es wurde beschrieben, dass solche Kontakte nicht nur über die DH-Domäne vermittelt werden, sondern dass auch andere Domänen des RhoGEFs hieran beteiligt sind. Beispielsweise interagiert die PH-Domäne des RhoGEFs Dbs mit der SwitchII-Region und dem Histidin an Position 103 von Cdc42 (Rossman et al., 2002b).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die ersten 45 Aminosäuren aus Cdc42 für die Spezifitätsdetermination von Hot1 wichtig sind. Die kleine GTPasen Rac1 kann von Hot1 nur schwach aktiviert werden (+). Eine chimäre GTPase C45R, die aus den ersten 45 Aminosäuren von Cdc42 und den restlichen 149 Aminosäure der korrespondierenden GTPase Rac1 besteht, kann von Hot1 sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gut (++) aktiviert werden.

Zunehmende N-terminale Fragmentgrößen von Cdc42 (C50R, C70R) führten zu keiner gesteigerten Aktivierung durch Hot1 (siehe Abb. 3.4 und Übersicht 2.10). Erst die chimäre GTPase C118R, die aus den ersten 118 Aminosäure von Cdc42 und den restlichen von Rac1 besteht, zeigte eine ähnlich starke Aktivierung wie die Wildtyp-Variante von Cdc42 (+++) (siehe Abb. 3.4 und Übersicht 2.10). Die C-terminale Region von Cdc42 verbessert die Aktivierung durch Hot1, hat allerdings keinen Einfluss auf die Spezifität. Dies konnte durch die chimären GTPasen C45R70C und R70C gezeigt werden. Während die chimäre GTPase R70C nicht durch Hot1 aktiviert werden kann, kann Hot1 den Nukleotid-Austausch an der chimären GTPase C45R70C sehr viel effektiver katalysieren als an C45R. Scheinbar begünstigt die C-terminale Region von Cdc42 mögliche Bindungen, die zu einem effektiveren Nukleotid-Austausch führen. Anscheinend sind die ersten 45 Aminosäuren von Cdc42 ausreichend, dass Cdc42 von Hot1 erkannt wird.

Da Cdc42 und Rac1 eine sehr hohe Sequenzähnlichkeit aufweisen, sind variable Aminosäuren innerhalb dieser Region mögliche Kandidaten für eine spezifische Selektivität von Hot1. Interessanterweise sind nur 6 Aminosäure innerhalb der ersten 45 Aminosäuren unterschiedlich zwischen Cdc42 und Rac1 (siehe Abb. 3.4). Dies sind die Aminosäuren Lys(27), Ser(30), Val(33), Ala(41), Val(42) und Thr(43) von Cdc42 und die korrespondierenden Aminosäuren Ala(27), Gly(30), Ile(33), Ser(41), Ala(42) und Asp(43) von Rac1, wobei sich die Aminosäuren 41-43 im  $\beta 2$ -Faltblatt der Effektorbindeschleife ( $\beta 2$ - $\beta 3$ ) befinden. Leider gelang es im Rahmen dieser Arbeit nicht, die Struktur der katalytischen DH-Domäne von Hot1 aufzulösen, um spezifische Interaktionen für die Spezifitätsdetermination von Hot1 zu Cdc42 aufzuklären. Aus diesem Grund kann man mögliche Mechanismen für eine spezifische Erkennung von Cdc42 durch Hot1 nur spekulieren. Ein interessanter Kandidat für die Erkennung ist die Aminosäure Lysin

### 3 Diskussion

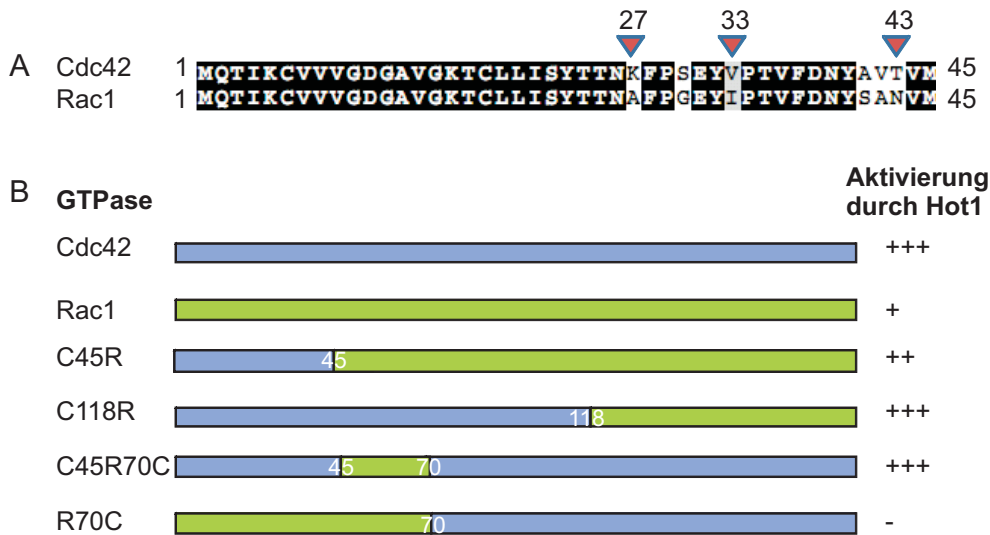


Abbildung 3.4: **Eingrenzung der spezifitätsbestimmenden Region von Cdc42 für Hot1.**

(A) Sequenzvergleich der ersten 45 Aminosäuren von Cdc42 und Rac1 aus *U. maydis*. Innerhalb dieser Region sind nur sechs Aminosäuren unterschiedlich zwischen den beiden GTPasen. (B) Um die spezifitätsbestimmende Region von Cdc42 für Hot1 einzugrenzen wurden chimäre Fusionsproteine von Cdc42 und Rac1 hergestellt. Cdc42 kann von Hot1 sehr gut aktiviert werden (+++), während Rac1 nur schwach aktiviert wird (+). Die ersten 45 AA von Cdc42 sind ausreichend, dass die chimäre GTPase C45R gut von Hot1 aktiviert wird (++). Doch erst die chimäre GTPase C118R zeigt eine sehr gute Aktivierung (+++), ähnlich wie Cdc42. Doch der C-terminale Teil von Cdc42 ist nicht notwendig für die Erkennung von Cdc42 durch Hot1, da die chimäre GTPase R70C nicht aktiviert wird. Allerdings verbessert diese Region die Aktivierung durch Hot1, was durch die GTPase C45R70C gezeigt wird (+++).

+++ = sehr gute Aktivierung, ++ = gute Aktivierung, + = schlechte Aktivierung, - = keine Aktivierung

an Position 27 von Cdc42. Bei Lysin handelt es sich um eine positiv geladene Aminosäure mit einem hydrophilen Charakter. Zusätzlich besitzt Lysin eine relative große Seitenkette. Die korrespondierende Aminosäure Alanin in Rac1 ist hingegen nicht geladen und besitzt nur eine Methylgruppe als Seitenkette. Hot1 müsste an der entsprechenden Interaktionsfläche der CR3-Region eine Aminosäure enthalten, die eine kurze Seitenkette trägt, um eine sterische Kollision zu vermeiden. Zusätzlich würde eine negativ geladene Gruppe eine mögliche Interaktion durch die Ausbildung von Wasserstoffbrücken begünstigen, da das Lysin von Cdc42 positiv geladen ist. Mögliche Aminosäuren wären Aspartat und Glutamat, wobei Aspartat aufgrund der kürzeren Seitenkette am besten geeignet erscheint. In Hot1 (Position 1531/1532) und TUBA (Position 910/911) gibt es zwei konservierte Aminosäuren, Threonin und Aspartat, die diese Funktion übernehmen könnten (siehe Abb. 3.3). Diese Aminosäuren befinden sich in der Interaktionsfläche der CR3-Region.

Ein weiterer potentieller Kandidat ist Threonin an Position 43 in Cdc42. Wie die korrespondierende Aminosäure Asparagin in Rac1, handelt es sich auch bei Threonin um eine hydrophile Aminosäure. Allerdings weist Threonin eine kürzere Seitenkette als Asparagin auf. Falls Threonin einen Einfluss auf die Spezifität von Hot1 zu Cdc42 hat, müsste Hot1 an der Interaktionsfläche eine Aminosäure aufweisen, die eine längere Seitenkette besitzt. Diese längere Seitenkette würde die Interaktion mit dem Asparagin aus Rac1 sterisch behindern, so dass die Aktivierung von

Rac1 blockiert würde.

Auch Valin an Position 33 in Cdc42 ist ein möglicher Kandidat. Die korrespondierende Aminosäure in Rac1 ist ein Isoleucin. In beiden Fällen handelt es sich um hydrophobe, ungeladene Aminosäuren, wobei allerdings Isoleucin aus Rac1 eine längere Seitenkette trägt. Auch hier müsste an entsprechender Stelle in Hot1 eine Aminosäure mit längerer Seitenkette existieren, die zu einer sterischen Kollision mit dem Isoleucin in Rac1 führt und so eine Bindung und Aktivierung verhindert.

Es wurden Einzelaustausche dieser Kandidaten getestet, die allerdings keinen Effekt zeigten (Daten nicht gezeigt). Man kann daher davon ausgehen, dass nicht einzelne Aminosäuren wichtig sind für die Spezifitätsbestimmung von Hot1 gegenüber Cdc42, sondern die gesamte Region innerhalb der GTPase. Denn die chimäre GTPase C35R, in welcher die Aminosäuren Lysin(27), Serin(30) und Valin(33) von Cdc42 vertreten sind und R35C45R, die Alanin(41) Valin(42) und Threonin(43) von Cdc42 enthält, können jeweils nur sehr schwach durch Hot1 aktiviert werden, während die Aktivierung von C45R, in der alle 6 Aminosäuren vertreten sind, durch Hot1 sehr effektiv ist (vergleiche Übersicht Abb. 2.10).

Für die spezifische Erkennung von Rac1 durch Hot1 scheint die C-terminale Region von Rac1 wichtig zu sein, da die chimäre GTPase R157C nicht mehr von Hot1 aktiviert werden. Diese Region ist zwischen verschiedenen RhoGTPasen sehr variabel. Dies macht die Bestimmung bestimmter spezifitätsbestimmender Aminosäuren sehr schwierig. RhoGTPasen besitzen eine C-terminale polybasische Region, die die Assoziation mit den negativ geladenen Phosphatresten der Lipide erlaubt und so die intrazelluläre Lokalisation beeinflussen kann (Jack et al., 2008; Ghomashchi et al., 1995; Adamson et al., 1992a; Prieto-Sanchez and Bustelo, 2003). Diese polybasische Region wird zusätzlich für Protein-Protein Interaktionen genutzt. Im menschlichen System gezeigt werden, dass der eukaryotische RhoGEF SmgGDS die polybasische Region der GTPase RhoA benötigt, um diese zu binden und den Nukleotid-Austausch an RhoA zu katalysieren (Hamel et al., 2011). Bei SmgGDS handelt es sich um einen ungewöhnlichen RhoGEF, der weder zur Dbl- noch zur Dock180-Familie der RhoGEFs gehört. Neben einer ungewöhnlichen spezifischen Erkennung benutzt er außerdem einen anderen Mechanismus als die RhoGEFs der Dbl- oder Dock180- Familie, um den Nukleotid-Austausch von kleinen GTPasen zu katalysieren. SmgGDS besteht aus einer Reihe von Armadillo (ARM) Wiederholungen, die eine elektronegative, helikale Bindungsfurche generieren. Diese elektronegative Oberfläche dient als Interaktionsfläche für die Bindung von GTPasen über die polybasische Region (Hamel et al., 2011).

### 3.3 Eine Nicht-konservierte Insertion in der Hot1 DH-Domäne als spezifitätsregulierendes Motiv

Neben all diesen bisher diskutierten universellen Mechanismen der Spezifitätsdetermination weist Hot1 eine weitere Besonderheit auf. Die DH-Domäne dieses RhoGEFs enthält eine nicht-konservierte Insertion, die anscheinend an der Erkennung der gebundenen GTPase beteiligt ist. Während die Wildtyp-Form der DH-Domäne bevorzugt als Cdc42-spezifischer GEF wirkt und

nur geringe GEF-Aktivität gegenüber Rac1 hat, zeigt eine DH-Domäne, in der diese Insertion deletiert wurde, überraschenderweise eine verringerte Selektivität und wirkt als RhoGEF für Cdc42 und Rac1. Diese Rolle der Insertion stellt einen neuartigen Mechanismus dar, wie ein RhoGEF auf eine GTPase selektiert. Der genaue Mechanismus, wie die Diskriminierung zwischen Cdc42 und Rac1 durch die Insertionsdomäne vermittelt werden kann, ist bisher nicht verstanden. Es ist jedoch von anderen RhoGEFs bekannt, dass auch weitere Domänen eines RhoGEFs an der Erkennung von GTPasen und dem Nukleotid-Austausch beteiligt sind. So konnte z.B. für den RhoGEF Dbs gezeigt werden, dass die PH-Domäne am Nukleotid-Austausch beteiligt ist, indem sie die GTPase kontaktiert und in eine günstige Konformation drückt (Rossman et al., 2002b). Man muss sich allerdings die Frage stellen, warum die Diskriminierung gegenüber Rac1 hauptsächlich über diese Insertion vermittelt wird und nicht über die bereits oben diskutierten strukturellen Selektionsmechanismen der DH-Domäne. Man könnte vermuten, dass die Insertion eine regulatorische Funktion ausübt und normalerweise die Aktivität des RhoGEFs moduliert. Hierfür würde sprechen, dass die Insertion extrem Serin- und Threonin-reich ist und möglicherweise multiple Konsensussequenzen für Kinasen enthält. Allerdings zeigt die Insertion keinen Einfluss auf die *in vitro* Aktivität der gereinigten DH-Domäne gegenüber Cdc42, so dass eine generelle Regulation der GEF-Aktivität durch diese Struktur nicht wahrscheinlich ist. Es könnte allerdings sein, dass Hot1 *in vivo* nicht nur als Cdc42-RhoGEF agieren kann, sondern, z.B. nach Phosphorylierung der Insertionsdomäne durch Kinasen, auch als Rac1- RhoGEF fungiert. Eine solche Funktion erscheint nicht abwegig, da beispielsweise Hot1 an Position 1541 ein Isoleucin trägt, welches für andere Rac1-spezifischen RhoGEFs als Spezifitätsbestimmend gilt und eine Interaktion zwischen Rac1 und Hot1 nicht ausschließt (siehe Abb 3.6). *In vivo* würde dies eine selektive Aktivierung bestimmter Signalkaskaden und damit eine gradierte Signalantwort als Reaktion auf bestimmte Stimuli ermöglichen.

Es fällt ebenfalls auf, dass die Überexpression einer Mutante mit einer Deletion der Insertionsdomäne (Hot1<sup>ΔAA1216-1406</sup>) einen extrem starken Phänotyp verursacht, während die Überexpression des Wildtyp-Proteins keinerlei Auswirkung hat. Interessanterweise zeigen die Zellen einen Phänotyp, der Ähnlichkeiten mit der Deletion von Rac1, als auch von Cdc42 aufweist. Hierfür kann es mehrere Erklärungen geben. Eine Alternative wäre, dass der Verlust der Insertion den RhoGEF effektiv so stört, dass die GTPase zwar noch gebunden und der Nukleotid-Austausch katalysiert werden kann, dass dann allerdings die GTPase nicht mehr losgelassen werden kann. Dies würde aufgrund des Versuchsaufbaus des GEF-Assays nicht direkt ersichtlich sein, da equimolare Menge an GTPase und RhoGEF eingesetzt wurden. *In vivo* würde dies aber zur Folge haben, dass die massive Überproduktion dieses GEFs dazu führt, dass sowohl Rac1 als auch Cdc42 an Hot1<sup>ΔAA1216-1406</sup> gebunden vorliegen und damit nicht mehr für andere biologische Prozesse zur Verfügung stehen. RhoGEFs sind in der Lage, GTPasen durch den Nukleotid-Austausch an bestimmten Orten zu konzentrieren (siehe Abschnitt 3.4). Wenn durch die Expression von Hot1<sup>ΔAA1216-1406</sup> der Großteil des zellulären Rac1 an den falschen Membranen bzw. Membrandomänen lokalisiert, könnte auch dies den beobachteten Phänotyp auslösen, da nicht mehr genügend Rac1 für andere Prozesse zur Verfügung steht. Wenn man annehmen würde, dass der RhoGEF komplett funktional wäre und lediglich zusätzliche GEF-Aktivität für Rac1 aufweist, ergibt sich ein weiteres Szenario. Die Aktivierung von Rac1 am falschen Ort

könnte dazu führen, dass die falschen Signalkaskaden aktiviert werden. Wenn dies der Fall wäre, sollte sich der beobachtete Phänotyp einer  $\text{Hot1}^{\Delta\text{AA1216-1406}}$ -Überexpression durch die Deletion von  $\text{Rac1}$  unterdrücken lassen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die beobachtete Spezifitätsdetermination durch die Insertion der DH-Domäne einen vollkommen neuen Mechanismus der GEF-GTPase-Selektivität darstellt. Es bleibt weiterhin aufzuklären, ob es sich hierbei um einen neuen Mechanismus handelt, der eine gezielte Regulation der GEF-Spezifität *in vivo* ermöglicht.

## 3.4 Spezifische Signalweiterleitung in komplexen Signalkaskaden

Kleine GTPasen dienen als zentrale Schalter, die nicht nur in unterschiedlichen Signalkaskaden fungieren, sondern sogar mehrere Signalkaskaden zu komplexen Signal-Netzwerken verknüpfen können. Eine räumlich und zeitliche Regulation dieser Netzwerke wird dabei durch die gezielte Aktivierung und Inaktivierung der kleinen GTPasen erreicht. Eine GTPase kann oft von mehreren Aktivatoren gebunden werden und kann mit einer Vielzahl an Effektoren interagieren. Darüber hinaus können Effektormoleküle oftmals von mehr als einer GTPase aktiviert werden. So werden z.B. viele p21-aktivierte Kinasen in menschlichen Zellen sowohl von  $\text{Rac1}$  als auch von  $\text{Cdc42}$  aktiviert, während andere Effektoren nur spezifisch von einer GTPase aktiviert werden (Manser et al., 1994; Symons et al., 1996). Es entsteht ein Bild eines komplexen Signalkaskaden-Netzwerks, in dem kleine GTPasen eine zentrale Rolle einnehmen, wodurch das Modell paralleler Signalkaskaden ersetzt wird. Es sind weitaus mehr GEFs und Effektoren als GTPasen selbst beschrieben (Rossman et al., 2005). So treffen eine Vielzahl an Signale verschiedener Aktivatoren an einer GTPase ein und müssen spezifisch an eine große Anzahl Effektoren weitergeleitet werden, damit eine korrekte Zellantwort hervorgerufen wird. Die selektive Aktivierung einer GTPase und die darauf folgende selektive Interaktion mit einem Effektor trägt zur Spezifität einer Signalkaskade bei. Eines der grundlegenden Probleme bei der Untersuchung der Signaltransduktion durch Rho-GTPasen ist demnach die Frage, wie innerhalb eines Signalmoduls aus  $\text{RhoGEF}/\text{GTPase}/\text{Effektor}$  sichergestellt wird, dass ein externer Stimulus zu einer korrekten zellulären Antwort führt. Die Signalspezifität in einem solch komplexen Netzwerk kann, neben der spezifischen Interaktion der GTPasen mit  $\text{RhoGEFs}$  und Effektoren, durch verschiedene Mechanismen sichergestellt werden.

Das einfachste Modell einer Signalkaskade besteht darin, dass es eine spezifische Interaktion zwischen GTPasen und Effektormolekülen gibt, wie es z.B. für einige  $\text{CRIB}$ -Domänen von  $\text{Cdc42}$ - und  $\text{Rac1}$ -Effektoren bekannt ist. Hierbei kann die GTPase nach ihrer Aktivierung mit nur einem für diese GTPase spezifischen Effektor interagieren (Abb. 3.5, (A)). Dieses ist allerdings ein relativ einfaches, lineares Modell und kann die hohe Spezifität und Komplexität der verschiedenen Signalkaskaden innerhalb einer Zelle nicht erklären. Ein komplexeres Modell ermöglicht Signalspezifität dadurch, dass der  $\text{RhoGEF}$ , die GTPase und der Effektor einer definierten Signalkaskade in räumlicher Nähe zueinander vorliegen. Dies kann zum einen durch eine spezifische subzelluläre Lokalisation der einzelnen Komponenten einer Signalkaskade erreicht werden. In diesem Fall führt die lokale Aktivierung einer GTPase dazu, dass nur ein sich in der Nähe

befindender Effektor aktiviert wird und das Signal weiterleiten kann (Abb. 3.5, (B)). Ein Beispiel hierfür ist die beobachtete lokale Aktivierung einer GTPase an der Spitze von wachsenden Pollenschläuchen (Kost, 2008). Die lokale Aktivität wird hierbei durch GTPase-aktivierende Proteine (GAPs) zusätzlich fokussiert. Hinter der Spitze des Pollenschlauches befindet sich ein Ring aus GAP-Proteinen, die die aktive GTPase in diesem Bereich inaktivieren und dadurch die Aktivität und somit das Signal auf die Pollenschlauchspitze beschränken (Hwang et al., 2008; Klahre and Kost, 2006). Zum anderen kann die korrekte Interaktion der einzelnen Komponenten einer Signalkaskaden mit Hilfe eines Gerüstprotein sichergestellt werden (Abb. 3.5, (C)); (Marinissen and Gutkind, 2005; Garcia-Mata and Burridge, 2007). Ein solcher Multiproteinkomplex wurde für das polare Wachstum von *S. cerevisiae* beschrieben. Hier bilden die GTPase Cdc42, der RhoGEF Cdc24 und die Effetorkinase Cla4 einen Komplex, der durch das Gerüstprotein Bem1 koordiniert wird und eine direkte Weiterleitung des Signals vermittelt (Bose et al., 2001; Irazoqui et al., 2003; Kozubowski et al., 2008). In einigen Fällen kann auch der RhoGEF selbst als Gerüstprotein fungieren und so die Aktivierung des richtigen Effektors sicherstellen. Ein Beispiel hierfür stellt das Endozytose-Gerüstprotein Intersectin da (Garcia-Mata and Burridge, 2007).

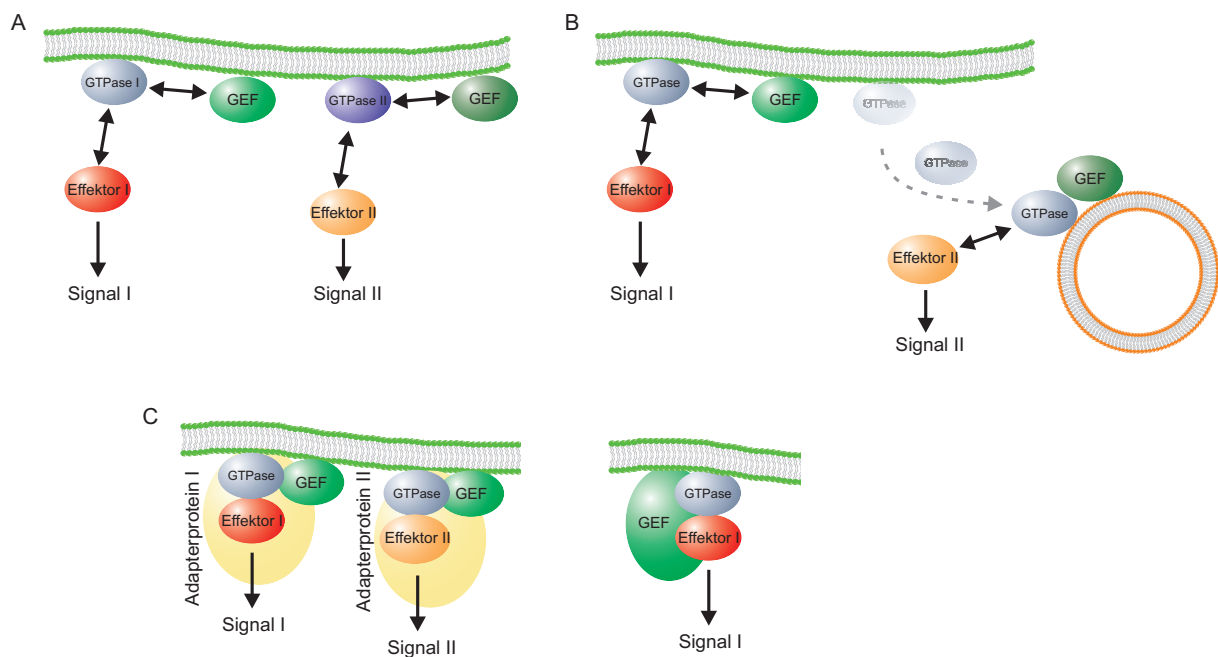


Abbildung 3.5: **Mechanismen zur Generierung von Signalspezifität in komplexen Netzwerken.**

(A) In einem sehr einfachen Modell kann die gerichtete Signalweiterleitung durch eine spezifische Interaktion zwischen der GTPase und ihrem Effektor sichergestellt werden. Hier kann eine GTPase nach Aktivierung nur mit einem für diese GTPase spezifischen Effektor interagieren. (B) In einem komplexeren Modell wird die Spezifitätsdetermination einer Signaltransduktion durch die Möglichkeit einer spezifischen subzellulären Kompartimentalisierung der einzelnen Komponenten einer Signalkaskade ermöglicht. In diesem Modell ist es möglich, dass die Aktivierung der gleichen GTPase an unterschiedlichen Orten in der Zelle zu einer Interaktion mit verschiedenen Effektoren und damit zu unterschiedlichen Signalantworten führt. (C) Eine spezifische Signalantwort kann ebenfalls durch Bildung eines spezifischen Signalkomplexes sichergestellt werden. In diesen Komplexen werden die einzelnen Komponenten einer Signalkaskade in räumlicher Nähe zu einander gebracht. Diese Funktion kann von Gerüstproteinen übernommen werden, wobei in einigen Fällen der RhoGEF selbst diese Funktion übernimmt.



Die beiden GTPasen Cdc42 und Rac1 weisen eine hohe Sequenzähnlichkeit auf und haben dennoch ganz unterschiedliche Funktionen in *U. maydis*. Während Cdc42 eine Rolle in der Zytokinese spielt, übernimmt Rac1 eine Funktion in der Zellmorphologie und Polarität der Zelle (Mahlert et al., 2006). Cdc42 und Rac1 alleine sind in *U. maydis* nicht essentiell, während  $\Delta cdc42/\Delta rac1$ -Doppelmutanten nicht lebensfähig sind (Mahlert et al., 2006). Angesichts dieser teilweise redundanten Funktion stellte sich die Frage, ob man die Funktionen der beiden GTPasen Cdc42 und Rac1 durch ein einziges Protein vermitteln kann. Voraussetzung dafür wäre, dass dieses Protein durch alle essentiellen RhoGEFs aktiviert werden kann, weiterhin mit allen essentiellen Effektoren interagiert und sich zur richtigen Zeit am richtigen Ort befindet. Mit der chimären GTPase C157R wurde eine GTPase generiert, die sowohl von Cdc42-spezifischen RhoGEFs, als auch von dem Rac1-spezifischen RhoGEF Cdc24 erkannt und aktiviert werden kann. Auch die Wildtyp-Variante von Cdc42 zeigt *in vitro* eine ähnliche Aktivierung durch diese verschiedenen RhoGEFs. Dennoch erfüllt Cdc42 *in vivo* nicht alle notwendigen Funktionen. Da die chimäre GTPase C157R von Cdc24 effektiver aktiviert werden kann als Cdc42, stellte sich die Frage, ob diese chimäre GTPase auch *in vivo* die Funktionen von sowohl Cdc42 als auch Rac1 übernehmen kann. Die Expression der chimären GTPase C157R ist dazu in der Lage, sowohl den Zelltrennungsdefekt der *cdc42*-Deletion als auch den morphologischen Defekt der *rac1*-Deletion zu retten (vergleiche Abb. 2.19). Weiterhin konnte durch die chimären GTPase C157R ein Stamm generiert werden, in dem, ähnlich wie *S. cerevisiae* oder *D. discoideum*, eine einzige GTPase ausreichend ist, um alle essentiellen Funktionen der GTPasen Cdc42 und Rac1 auszuüben. Ein entscheidender Unterschied zwischen Cdc42 und Rac1 in *U. maydis* ist, dass die Überexpression von Rac1, nicht aber die Überexpression von Cdc42, zur Induktion von Filamenten führt (Mahlert et al., 2006). Auch die Überexpression der chimären GTPase C157R kann sowohl in haploiden Wildtyp-Zellen als auch in  $\Delta rac1$ -Zellen Filamente induzieren. Dies ist allerdings bei einer Überexpression von C157R in  $\Delta cdc42$ -Zellen oder in der *cdc42/rac1*-Doppeldeletionsmutante nicht der Fall. Es scheint demnach eine kritische Funktion von Cdc42 für das filamentöse Wachstum zu geben, die nicht von der chimären GTPase C157R erfüllt werden kann. Dies ist in dem Sinne verwunderlich, da die chimäre GTPase C157R zum größten Teil aus Cdc42 besteht. Das deutet darauf hin, dass diese Funktion vom C-terminalen Teil von Cdc42 übernommen wird. In *S. cerevisiae* konnte gezeigt werden, dass Cdc42 spontan und ohne weitere Polaritätsfaktoren an einer Stelle des Zellkortex akkumulieren kann. Diese spontane Lokalisation wiederum bewirkt eine Polarisierung des Zytoskeletts. Darüber kommt es zu einem aktiven Transport von Cdc42-tragenden sekretorischen Vesikeln, wodurch dann die Initiale Polaritätsachse stabilisiert wird (Wedlich-Soldner et al., 2003). Cdc42 kann also eine selbst verstärkende Rückkopplungsschleife initiieren, die ausgehend von einer unpolarisierten Zelle eine stabile Polaritätsachse herstellt. Auch in bereits polarisierten Zellen wird Cdc42 benötigt, um die Polarität aufrecht zu erhalten. Ebenso wird Cdc42 für die Auswahl der korrekten Knospungsstelle benötigt (Ziman et al., 1993). Während die Wahl einer neuen Knospungsstelle häufig von weiteren Proteinen abhängig ist, die im Bereich der alten Knospennarbe lokalisieren, erhält und verstärkt Cdc42 wahrscheinlich diese initiale Polarität durch eine positive Rückkopplung (Wedlich-Soldner et al., 2003). Eine mögliche Funktion von Cdc42 beim filamentösen Wachstum könnte sein, dass Cdc42 für eine Art initiale "Zündung" des Filamentansatzes verantwortlich ist. Nach der Cdc42-

abhängigen Initiation könnte es dann zur Ausbildung des Rac1-abhängigen Filamentes kommen. Die chimäre GTPase C157R wirkt in diesem Filament anscheinend eher wie Rac1 als wie Cdc42. Dies könnte erklären, warum die Überexpression von C157R im  $\Delta rac1$ -Hintergrund die Induktion und Ausbildung des Filamentes ermöglicht, da Cdc42 in diesem Stamm-Hintergrund noch anwesend ist.

Neben der Funktion in haploiden Zellen spielen Cdc42 und Rac1 bei der Ausbildung des dikaryotischen Filaments, welches für die Infektion der Maispflanze notwendig ist, eine wichtige Rolle. Während  $\Delta cdc42$ - noch  $\Delta rac1$ - Zellen nicht in der Lage sind  $b$ -induzierte Filamente zu bilden, kann die Expression der chimären GTPase C157R diese Deletionsphänotypen der beiden GTPasen retten. Allerdings wurden die Filamente in beiden Deletionshintergründen nur verlangsamt induziert und waren im Vergleich zum Wildtyp kürzer. Der Aspekt, dass die Expression der chimären GTPase in einem  $\Delta cdc42$ -Hintergrund ein  $b$ -abhängiges Filamente induzieren kann, die reine Überexpression der chimären GTPase in diesem Hintergrund allerdings nicht zur Induktion von Filamenten führt, deutet darauf hin, dass es sich hierbei um zwei unterschiedliche Mechanismen für die Induktion von Filamenten handelt. Die  $b$ -unabhängige spontane Filamentbildung durch die Überexpression einer GTPase ist wahrscheinlich auf lokale Rückkopplungs-Schleifen angewiesen, die diese Polarität aufrecht erhalten. Dies wird durch die Beobachtung unterstützt, dass es zur Bildung von Filamenten und nicht zum isotropen Wachstum kommt. Dagegen funktioniert die  $b$ -abhängige Filamentbildung wahrscheinlich eher darüber, dass die Polarität durch Gerüstproteine aufrecht erhalten wird. Ein ähnliches Modell wurde in *S. cerevisiae* beschrieben. Hier ist das Gerüstprotein Bem1p zusammen mit dem Cdc42-spezifischen RhoGEF Cdc24p für die Stabilisierung der Polaritätsachse zuständig (Irazoqui et al., 2003; Kozubowski et al., 2008). Auch in *U. maydis* hat das Homolog von Bem1 zusammen mit Cdc24 eine ähnliche Funktion beim filamentösem Wachstum (Frieser et al., 2011). Warum sich die chimäre GTPase C157R in diesem Kontext unterschiedlich verhält, ist nicht direkt offensichtlich. Es kann allerdings sein, dass, wie im Folgenden diskutiert, die unterschiedlichen C-terminale Regionen zu einer Lokalisation in unterschiedlichen Subdomänen führen. Ein Deletionsphänotyp von *rac1*, der durch die Expression der chimären GTPase C157R nicht vollständig gerettet werden konnte, ist die Aufrechterhaltung der notwendigen  $b$ -induzierten Filamente für die Infektion von Maispflanzen. Zwar führt die Expression von C157R in einem AB31 $\Delta rac1$ -Stamm zur Induktion und Ausbildung eines Filament, dies ist allerdings im Vergleich zu einem Wildtyp-Filament kürzer und es scheint, dass diese Zellen langsamer wachsen beziehungsweise das Wachstum nach einiger Zeit einstellen (vergleiche Abb. 2.20).

Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass es neben dem Rac1-spezifischen RhoGEF Cdc24 noch weitere Rac1-spezifische RhoGEFs in *U. maydis* gibt, die eventuell keine Aktivität gegenüber C157R aufweisen. So gibt es im Genom von *U. maydis* neben den getesteten RhoGEFs Hot1, Cdc24, Don1 und Int1 noch weitere RhoGEFs der Dbl-Familie, deren Spezifität und Funktion noch nicht näher charakterisiert wurde. Weiterhin gibt es neben RhoGEFs der Dbl-Familie auch RhoGEFs der DOCK-Familie, die ebenfalls den Nukleotid-Austausch an RhoGTPasen katalysieren können. Es wurde ein Homolog des humanen Rac1-spezifischen RhoGEFs DOCK180 in *U. maydis* identifiziert, von dem allerdings die Spezifität gegenüber Cdc42 und Rac1 beziehungsweise der chimären GTPase C157R noch nicht bekannt ist. Neben diesen klassischen

RhoGEFs der Dbl- und DOCK-Familie gibt es auch sehr ungewöhnliche RhoGEFs, die den Nukleotid-Austausch an kleinen GTPasen katalysieren können. Mit dem Protein Gds1 konnte in *U. maydis* ein Homolog zum humanen RhoGEF SmgGDS identifiziert werden. Während SmgGDS im humanen System den Nukleotid-Austausch der kleinen GTPasen RhoA und RhoC katalysiert (Hamel et al., 2011), konnte in *U. maydis* in Zusammenarbeit mit Michaela Wehr gezeigt werden, dass Gds1 die kleine GTPase Rac1 aktivieren kann (Daten nicht gezeigt). Interessanterweise kann Gds1 die chimäre GTPase C157R nicht binden und aktivieren (Daten nicht gezeigt). Michaela Wehr konnte zeigen, dass eine Deletion von *gds1* in *U. maydis* zu einer verlangsamten Filamentbildung führt. Dies könnte die eingeschränkte Komplementation des Filamentphänotyps von Rac1 erklären.

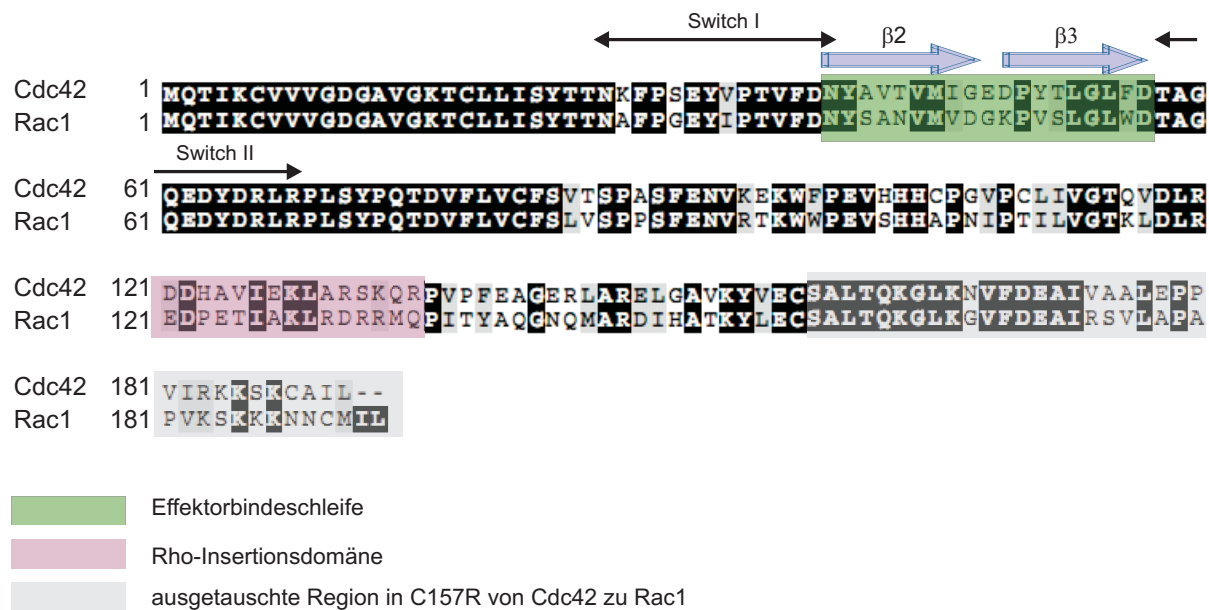


Abbildung 3.6: Sequenzvergleich der beiden GTPasen Cdc42 und Rac1 in *U. maydis*.

Die beiden Proteine haben einen sehr ähnlichen Aufbau und zeigen auf Aminosäureebene eine Sequenzidentität von 66,8 Prozent. Markiert sind zusätzlich die Effektorbindeschleife, die Rho-Insertionsdomäne und die ausgetauschte Region von Cdc42 zu Rac1 in der chimären GTPase C157R.

### Die variable polybasische Region hat einen Einfluss auf die spezifische Lokalisation von kleinen GTPasen

Neben den Affinitäten einer GTPase zu ihren Aktivatoren beziehungsweise Effektoren trägt auch die lokale Konzentration einer GTPase zu einer spezifischen Signalantwort innerhalb einer Signalkaskade bei. Wie bereits erwähnt, besitzen kleine GTPasen eine hohe Sequenzähnlichkeit. Regionen mit hoher Sequenzdiversität befinden sich innerhalb der Effektorbindeschleife und der Rho-Insertionsdomäne. Die Region mit der höchsten Variabilität ist aber der C-terminale Bereich einer GTPase (vergleiche Abb. 3.6). Dieser Bereich wurde neben der Beteiligung an der Lokalisation einer GTPase ebenfalls mit der Interaktion mit Effektorproteinen in Verbindung gebracht. Beispielsweise ist diese Region von Rac1 wichtig für die Interaktion und Aktivierung

der NADPH Oxidase (Kreck et al., 1996) oder von p21-Kinasen (Knaus et al., 1998). Diese hoch variable Region der GTPase ist gerade die Region, die in der chimären GTPase C157R von Cdc42 gegen Rac1 ausgetauscht wurde. Kleine GTPasen wechseln zwischen zytosolischer Lokalisation und Membranen-Assoziation, wobei sie verschiedene Präferenzen haben, mit welcher Art von Membranen sie interagieren (Jack et al., 2008). Der C-terminale Bereich der GTPasen der Rho-Familie enthält ein C-terminales CAAX-Motiv, welches als Signal für eine posttranslationale Modifikation Prenylgruppen dient, durch welche die GTPasen an die Membran rekrutiert und verankert werden (Adamson et al., 1992a). Zusätzlich besitzen Rho-GTPasen eine C-terminale polybasische Region (PBR), die eine Assoziation mit den negativ geladenen Phosphatresten von Lipiden, insbesondere mit verschiedenen Phosphoinositol-Phosphatidyl-Lipiden, erlaubt. So wird die spezifische Lokalisierung einer GTPase durch diese hypervariable Region der GTPase erreicht (Williams, 2003; Michaelson et al., 2001) und die GTPase kann in bestimmten Membrandomänen angereichert werden (Jack et al., 2008; Ghomashchi et al., 1995; Adamson et al., 1992b; Prieto-Sanchez and Bustelo, 2003). Die variable PBR ist ein entscheidender Faktor, der bestimmt, an welchem Membrankompartiment die jeweilige GTPase lokalisiert (Michaelson et al., 2001). Im humanen System konnte gezeigt werden, dass die isolierte PBR zusammen mit der C-terminalen Lipidmodifikation verschiedener GTPasen ausreichend ist, um an spezifische subzelluläre Kompartimente zu lokalisieren (Michaelson et al., 2001). In menschlichen Zellen lokalisiert sowohl die isolierte C-terminale Region als auch das Volllänge Protein von Cdc42 an Endomembranen und am Golgi-Apparat und nur zu einem geringen Teil an der Plasmamembran. Im Gegensatz dazu ist die C-terminale Region und das Volllänge Protein von Rac1 überwiegend an der Plasmamembran lokalisiert (Michaelson et al., 2001). Auch in *U. maydis* war eine ähnliche Verteilung der C-terminalen Regionen der GTPasen sowohl in haploiden, als auch in filamentösen Zellen sichtbar (vergleiche Abb. 2.21). Diese unterschiedliche Lokalisation der C-terminalen Regionen von Cdc42 und Rac1 ist vermutlich auf die unterschiedliche PBR zurückzuführen. So besitzt die PBR von Rac1 im Vergleich zu Cdc42 mehr positiv geladene Aminosäuren und wird daher als "stärker" bezeichnet. Diese starke PBR von Rac1 ermöglicht eine Spezifität zur Plasmamembran, da diese Membran reich ist an den Phospholipiden PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> und PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>. Über die positiv geladenen Aminosäuren der PBR der GTPase wird eine elektrostatische Interaktion mit den negativ geladenen Phosphatresten ermöglicht (Heo et al., 2006). So konnte gezeigt werden, dass die PBR von Rac1 spezifisch an PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> bindet, während Cdc42 dies nicht tut (van Hennik et al., 2003). PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> und PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> können so als weiterer Faktor bei der Regulation von Siganlkaskaden dienen (Heo et al., 2006).

In *U. maydis* zeigten die Volllänge Proteine von Cdc42 und Rac1 eine ähnliche Lokalisation wie die C-terminalen Regionen der einzelnen GTPasen. Allerdings war Cdc42 vermehrt an Endomembranen zu finden, während Rac1 deutlich mehr an der Plasmamembran lokalisierte (vergleiche Abb. 2.22). Es ist zu erwähnen, dass die Lokalisation von GTPasen häufig auch durch Interaktionen mit anderen Proteinen sichergestellt wird. Viele regulatorische Proteine der GTPasen, wie GEFs, GAPs oder auch Effektoren, sind Multidomänenproteine und besitzen zusätzliche Protein-Protein-Interaktionsdomänen oder Lipid-Protein-Interaktionsdomänen, die über diese an bestimmte subzelluläre Kompartimente rekrutiert werden und dort die Aktivität von GTPasen stimulieren können (Rossman et al., 2005). Die Lokalisation der chimären GTPase

### 3 Diskussion

C157R verschiebt sich von einer Cdc42-Lokalisation zu einer Rac1-ähnlichen Lokalisation, wobei C157R immer noch an Endomembranen, aber deutlich mehr an der Plasmamembran zu finden ist (vergleiche Abb. 2.22). Diese Verschiebung der Lokalisation von C157R unterstreicht die Bedeutung der C-terminalen Region einer GTPase für die Lokalisation der Proteins. Die veränderte Lokalisation von C157R im Vergleich zu Cdc42 könnte auch die Komplementation des  $\Delta rac1$ -Phänotyps in haploiden Zellen erklären.

Ebenso erklärt sich hierüber, warum eine so starke Überexpression der chimären GTPase benötigt wird, um den Zelltrennungsdefekt der  $\Delta cdc42$ -Deletion zu retten. Anscheinend verhindert die C-terminale Region von Rac1 im chimären Protein C157R die korrekte Lokalisation, um die Cdc42-abhängige Zytokinese unter endogenen Bedingungen zu gewährleisten.

Dies ist in so fern verwunderlich, als dass auch Rac1 in der Region der Teilungsebene lokalisiert. Allerdings wird für die Don1-Cdc42 abhängige Signalkaskade postuliert, dass eine Don1-vermittelte Rekrutierung von Cdc42 an Endosomen zu einer Aktivierung der Cdc42-abhängigen Signalkaskade führt, welche die Bildung des sekundären Septums initiiert (Schink and Bölker, 2009). Dieses Modell basiert auf der Beobachtung, dass eine Überexpression des RhoGEFs Don1 zu einer Rekrutierung von Cdc42 an Endosomen führt. Es ist schon aus anderen Systemen bekannt, dass Endosomen als Plattformen für Signaltransduktionsprozesse dienen können (Gould and Lippincott-Schwartz, 2009). Möglicherweise lokalisiert auch der für das sekundäre Septum notwendige Effektor an Endosomen, so dass alle notwendigen Komponenten der Kaskade räumlich lokalisiert wären. Dies würde die Gerüstfunktion der Endosomen noch unterstreichen und konnte im humanen System bereits gezeigt werden (Gasman et al., 2003a). Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass Rac1 durch den RhoGEF Tiam an Endosomen aktiviert wird, obwohl beide Proteine normalerweise an der Plasmamembran zu finden sind (Palamidessi et al., 2008). Diese Form der Signaltransduktion, in der Endosomen als Plattform dienen, konnte nicht nur für die RhoGEF-GTPase Interaktion gezeigt werden, sondern auch für eine GTPase-Effektor Interaktion. So rekrutiert die GTPase RhoD im menschlichen System ihren Effektor, das Formin Dia2C, an Endosomen und reguliert dort die Endosomenbewegung (Gasman et al., 2003b). Möglicherweise kann die chimäre GTPase C157R nicht effizient genug von Don1 an Endosomen rekrutiert werden. Dadurch würde die korrekte Signaltransduktion erschwert, welche zur Initiation des sekundären Septums führt. Diese Hypothese wird durch die Beobachtung bestätigt, dass die subzelluläre Lokalisation von C157R am ehesten der von Rac1 ähnelt. So lokalisiert C157R hauptsächlich in der Zytoplasmamembran und nur schwach an Endomembranen. Es kann auch sein, dass die PBR von Rac1 eine geringere Präferenz für das an Endosomen angereicherte Phospholipid PtdIns(3)P hat und daher bevorzugt von GDIs aus dieser Membran heraus gelöst wird. Darüber hinaus ist die endosomale Membran nicht homogen. Ähnlich wie in der Plasmamembran gibt es auch hier Subdomänen mit unterschiedlichen Lipidzusammensetzungen, unter anderem mit PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>. Möglicherweise könnte der C-Terminus von Rac1 die chimäre GTPase C157R in diese Subdomänen lokalisieren und damit die Aktivierung durch Don1 erschweren, da Don1 über die FYVE-Domäne bevorzugt an PtdIns(3)P-reiche Subdomänen bindet (Schink and Bölker, 2009).

### GTPase-Effektorinteraktionen als Mechanismus der spezifischen Signaltransduktion

Ebenso wichtig wie die spezifische Affinität zwischen RhoGEF und GTPase ist die spezifische Interaktion zwischen der GTPase und Effektormolekülen. Um funktionieren zu können, muss die chimäre GTPase C157R sowohl mit Cdc42- als auch mit Rac1-spezifischen Effektoren interagieren. Bisher wurden die CRIB-Domäne auf Seite der Effektoren und die so genannte Effektorbindeschleife auf Seite der GTPasen als wichtige Interaktionspunkte beschrieben (Abdul-Manan et al., 1999; Mott et al., 1999). Die CRIB-Domäne ist ein konserviertes Motiv in vielen, aber nicht allen Effektorproteinen (Thompson et al., 1998; Rudolph et al., 1998). Strukturanalysen von Komplexen zwischen GTPase und dem jeweiligen Effektor führten zur Identifizierung der Effektorbindeschleife innerhalb der GTPasen, die an der Interaktion mit Effektoren beteiligt ist (Abdul-Manan et al., 1999; Mott et al., 1999). Der Austausch dieser Region zwischen Cdc42 und Rac1 beeinflusst *in vitro* deren Eigenschaft, an Effektoren zu binden (Elliot-Smith et al., 2005; Li et al., 1999; Owen et al., 2000). Daraus lässt sich schließen, dass auch die Interaktion mit Effektoren ein spezifitätsbestimmender Schritt innerhalb von Cdc42/Rac1-Signalkaskaden ist. Die chimäre GTPase C157R enthält die Effektorbindeschleife von Cdc42. In *U. maydis* ist bisher allerdings sehr wenig über spezifische Effektoren für Cdc42 und Rac1 bekannt. Die PAK-Kinase Cla4, die eine entscheidende Rolle im Multiproteinkomplex mit Rac1, Cdc24 und Bem1 spielt (Frieser et al., 2011), zeigt keine Selektivität gegenüber Cdc42 und Rac1. Cla4 spielt mit den anderen Komponenten des Komplexes eine entscheidende Rolle bei der morphologischen Transition von der Knospung zum filamentösen Wachstum in *U. maydis* (Leveleki et al., 2004; Mahlert et al., 2006). Auch die Kinase UmSte20 (Smu1), das Ste20-Homologs aus *U. maydis* (Leveleki et al., 2004) sowie das Gerüstprotein UmIgg1 binden über ihre GTPase-Interaktionsdomänen sowohl Cdc42 als auch Rac1. Im Gegensatz dazu konnten das Formin Drf1 (Freitag et al., 2011) und das Aktin-regulierende Protein WASP aus *U. maydis* (Björn Sandrock, persönliche Mitteilung) über Präzipitationsanalysen als Cdc42-spezifische Effektoren identifiziert werden. Da die chimäre GTPase C157R diese Interaktionsdomäne von Cdc42 trägt, sollten diese beiden spezifischen Effektoren keinen Einfluss auf die Funktion von C157R haben. Es konnten allerdings bisher noch keine Rac1-spezifischen Effektoren identifiziert werden.

Da nicht alle Effektorproteine eine CRIB-Domäne besitzen, wird vermutet, dass weitere Interaktionsstellen zwischen GTPase und Effektor existieren, über welche die Spezifität der Interaktion gewährleistet wird. Es konnte gezeigt werden, dass eine Diskriminierung spezifischer Effektoren über die sogenannte Rho-Insertionsdomäne erfolgt. Mutationsanalysen zeigten, dass diese Region wichtig ist für die Interaktion und die Aktivierung des Rac1-Effektorproteins NADPH-Oxidase (Freeman et al., 1996).

Anhand von Kristallstrukturen konnten weiterhin spezifische Aminosäuren innerhalb der GTPasen identifiziert werden, die eine Selektivität von Effektormolekülen zwischen verwandten GTPasen erlauben (Karnoub et al., 2004). Scheinbar diskriminieren Effektoren, neben bestimmten Domänen, auch anhand von spezifischen Aminosäuren. Diese Aminosäuren sind über die gesamte Aminosäuresequenz verteilt, sind strukturell gesehen allerdings zur Oberfläche des Proteins gerichtet. Die verschiedenen Aminosäuren, die einen Einfluss auf eine spezifische Effektorinteraktion haben könnten, unterscheiden sich innerhalb der chimären GTPase C157R,

d.h. es finden sich sowohl Rac1- als auch Cdc42-spezifische Elemente. Es könnte daher sein, dass die Bindung eines möglichen spezifischen Effektors durch dieses chimäre Protein nicht mehr möglich ist. Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass die reduzierte Komplementation der jeweiligen *b*-induzierten Filamentphänotypen von Cdc42 und Rac1 hierauf zurückzuführen ist.

#### Die Rolle der Aminosäure an Position 56 von Cdc42 und Rac1 für die GTPase-Effektor-Interaktion

Die Aminosäure an Position 56 gilt als spezifitätsbestimmende Aminosäure für viele RhoGEFs der Dbl-Familie für die Diskriminierung von Cdc42 und Rac1. Allerdings zeigten Analysen aus dem humanen System, dass die Aminosäure an Position 56 in Rac1 keinen Einfluss auf die Effektorspezifität hat (Karnoub et al., 2001). So wurde für den Cdc42-spezifischen Effektor ACK2 beschrieben, dass ein Aminosäureaustausch an dieser Position ebenfalls keinen Einfluss auf die Bindung von Cdc42 hat (Gu et al., 2004). In *U. maydis* stellt sich eine andere Situation dar. Es konnte gezeigt werden, dass eine Veränderung der RhoGEF-Spezifität mit einem Wechsel der *in vivo* Funktion einer GTPase einhergeht (Kay Oliver Schink, Doktorarbeit). Es stellt sich demnach die Frage, ob die reine zeitlich und räumlich koordinierte Aktivierung durch einen RhoGEF die Signalspezifität festlegt oder ob die Mutation in der GTPase auch zu einem Wechsel der Effektorspezifität führt. Die Aminosäure an Position 56 liegt innerhalb der Effektorbindeschleife, welche als Interaktionsfläche für viele Effektorproteine dient. Es ist demnach nicht auszuschließen, dass der Aminosäure-Austausch an Position 56 einen Einfluss auf die Effektor-Interaktion mit der GTPase hat. Die chimäre GTPase C157R kann nicht nur von Cdc42-spezifischen und Rac1-spezifischen RhoGEFs aktiviert werden, sondern ist auch dazu in der Lage die Deletionsphänotypen von  $\Delta cdc42$ - und auch  $\Delta rac1$ -Zellen zu komplementieren. Der Aminosäure-Austausch vom Phenylalanin zum Tryptophan an Position 56 in C157R führt nicht zu einem Verlust, aber dennoch zu einer reduzierten Aktivierung durch den RhoGEF Don1. Auch *in vivo* hatte der Austausch dieser Aminosäure einen Einfluss auf die Funktion von C157R, denn die Punktmutante C157R<sup>F56W</sup> kann den Zellteilungsdefekt einer *cdc42* Deletionsmutante nicht mehr komplementieren. Es stellte sich die Frage, ob der Verlust der *in vivo* Funktion der GTPase auf die reduzierte Aktivierbarkeit durch Don1 oder auf einen Wechsel der Effektorspezifität zurückzuführen ist. Es konnte in Zusammenarbeit mit Kay Oliver Schink gezeigt werden, dass der Aminosäureaustausch in Rac1 an Position 56 zu Rac1<sup>W56F</sup> nicht nur die Erkennung durch den Cdc42-spezifischen RhoGEF Don1 erlaubt, sondern scheinbar auch die Bindung von einem bisher noch unbekannten Effektor für die Zytokinese in *U. maydis*. Während eine konstitutiv aktive Variante von Cdc42, Cdc42<sup>Q61L</sup>, den Zellteilungsdefekt von *don1* Deletionsmutanten komplementieren kann, ist die konstitutiv aktive Variante von Rac1, Rac1<sup>Q61L</sup>, nicht dazu in der Lage (Mahlert et al., 2006). Diese konstitutiv aktive GTPase (Q61L) liegt immer in der GTP-gebundenen, aktiven Form vor und wird daher nicht durch den entsprechenden RhoGEF erkannt. Diese Variante ist daher unabhängig von der Aktivierung durch Don1. Deshalb ist es auch möglich, den Effekt von direkten Interaktionen mit Effektorproteinen zu beobachten. Eine Überexpression von Rac1<sup>W56F</sup> führt im Vergleich zu einer Überexpression von Cdc42<sup>F56W</sup> in

### 3 Diskussion

$\Delta cdc42$ -Zellen zur Ausbildung des sekundären Septums (vergleiche Abb. 2.23). Wäre der Effekt der  $Rac1^{W56F}$ -Mutante nur auf die Aktivierung von Don1 zurückzuführen, müsste auch die konstitutiv aktive Variante von Rac1,  $Rac1^{Q61L}$ , den  $\Delta don1$ -Phänotyp komplementieren. Wäre hingegen in  $Rac1^{W56F}$  durch den Aminosäureaustausch an Position 56 auch die Interaktionsfläche von Effektoren verändert, würde die konstitutiv aktive Form,  $Rac1^{W56F Q61L}$  den Zellteilungsdefekt von  $\Delta don1$ -Zellen retten. Da  $Rac1^{W56F Q61L}$  den  $don1$ -Deletionsphänotyp retten kann, die komplementäre GTPase  $Cdc42^{F56W Q61L}$  dazu allerdings nicht in der Lage ist, muss es im Fall der durch Don1 und Cdc42 gesteuerten Bildung des sekundären Septums neben einer spezifischen Interaktion zwischen RhoGEF und GTPase auch eine spezifische GTPase-Effektor Interaktion geben.

Zusammenfassend kann man sagen, dass mit der chimären GTPase ein Protein generiert wurde, dass zu großen Teilen die Funktionen von Cdc42 und Rac1 übernehmen kann. Doch die Gewährleistung von Spezifität innerhalb von Signalkaskaden wird immer durch ein Zusammenspiel verschiedener Kriterien erreicht. Dazu gehörten die spezifische Aktivierung einer GTPase durch einen spezifischen RhoGEF, die spezifische Interaktion mit einem Effektor und die korrekte intrazelluläre Lokalisation der GTPase.



## 4 Material und Methoden

### 4.1 Bakterien- und Hefestämme

#### 4.1.1 Bakterienstämme

Für Klonierungen von DNA wurde der Stamm Top10 (Invitrogen) verwendet.

Stamm	Genotyp
DH5 $\alpha$	F <sup>-</sup> , endA1, hsdR17(r <sub>K</sub> <sup>-</sup> , m <sub>K</sub> <sup>+</sup> ), supE44, thi-1, gyrA96(Nal <sup>r</sup> ), relA1, recA1, $\Delta$ (argF-lacIZYA)U169( $\phi$ 80dlacZ $\Delta$ M15)
Top10	F <sup>-</sup> mcrA $\Delta$ (mrr-hsdRMS-mcrBC) $\phi$ 80lacZ $\Delta$ M15 $\Delta$ lacX74 recA1 araD139 $\Delta$ (ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str <sup>R</sup> ) endA1 nupG
ArcticExpress(DE3)	F- ompT hsdS <sub>B</sub> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) dcm+ Tet <sup>R</sup> gal $\lambda$ (DE3) endA Hte [cpn10 cpn60 Gent <sup>R</sup> ]

#### 4.1.2 Hefestämme

Stamm	Genotyp	Referenz
DF5 his1-1	MATa; his3-D200, leu2-3,2-112, lys2-801, trp1-1(am), ura3-52, his1-1	Derivat von DF5 (Finley et al., 1987), Helle Ullrich, pers. Mitteilung

#### 4.1.3 *Ustilago maydis*-Stämme

Bub8	<i>a2 b4</i>	(Schulz et al., 1990)
Bub8 <i>don1</i>	<i>a2 b4</i> ; <i>don1</i>	(Weinzierl et al., 2002)
AB31	<i>a2</i> P <sub>crg</sub> ::bW2,bE1 (Phleo <sup>R</sup> )	(Brachmann et al., 2001)
Bub8 $\Delta$ <i>cdc42</i>	<i>a2 b4</i> $\Delta$ <i>cdc42</i> (Hyg <sup>R</sup> )	(Mahlert et al., 2006)
Bub8 $\Delta$ <i>rac1</i>	<i>a2 b4</i> $\Delta$ <i>rac1</i> (Nat <sup>R</sup> )	(Mahlert et al., 2006)
AB31 $\Delta$ <i>cdc42</i>	<i>a2</i> P <sub>crg</sub> ::bW2,bE1 (Phleo <sup>R</sup> ), $\Delta$ <i>cdc42</i> (Hyg <sup>R</sup> )	(Mahlert et al., 2006)
AB31 $\Delta$ <i>rac1</i>	<i>a2</i> P <sub>crg</sub> ::bW2,bE1 (Phleo <sup>R</sup> ), $\Delta$ <i>rac1</i> (Nat <sup>R</sup> )	(Mahlert et al., 2006)
Bub8 P <sub>cdc42</sub> ::GFP-Cdc42	<i>a2 b4</i> ; P <sub>cdc42</sub> ::GFP-Cdc42 (Cbx <sup>R</sup> )	Laborsammlung

## 4.2 Plasmide und Primer

### 4.2.1 Standard-Plasmide

Plasmid	Resistenz	Referenz
pJet1.2	Amp	Fermentas
pGEX4T-1	Amp	GE Healthcare
pRS426	Amp, Ura3 ( <i>S. cerevisiae</i> )	(Sikorski and Hieter, 1989)
p123	Amp, Cbx ( <i>U. maydis</i> )	(Spellig et al., 1996)
pETEF-GFP-Ala6-MMXN	Amp, Cbx ( <i>U. maydis</i> )	Laborsammlung
pETEF-mKate-Ala6-MMXN	Amp, Cbx ( <i>U. maydis</i> )	Laborsammlung
pCRG-GFP-Ala6-MXN	Amp, Cbx ( <i>U. maydis</i> )	Laborsammlung
pRU11-Cdc42 <sup>Q61L</sup>	Amp, Cbx ( <i>U. maydis</i> )	(Mahlert et al., 2006)
pRU11-Rac1 <sup>Q61L</sup>	Amp, Cbx ( <i>U. maydis</i> )	(Mahlert et al., 2006)
pRU11-Cdc42 <sup>F56W, Q61L</sup>	Amp, Cbx ( <i>U. maydis</i> )	Laborsammlung
pRU11-Rac1 <sup>W56F, Q61L</sup>	Amp, Cbx ( <i>U. maydis</i> )	(Schink, 2010)
p123 Cdc10-RFP	Amp, Cbx ( <i>U. maydis</i> )	Christian Böhmer, pers. Mitteilung
P123 lifeact-3xRFP	Amp, Cbx ( <i>U. maydis</i> )	(Schink, 2010)
p123 GFP-Rac1	Amp, Cbx ( <i>U. maydis</i> )	Michael Mahlert, pers. Mitteilung
pGEX4T-1 UmCdc42	Amp	(Hlubek et al., 2008)
pGEX4T-1 UmRac1	Amp	(Hlubek et al., 2008)
pGEX4T-1 UmCdc42 <sup>F56W</sup>	Amp	(Hlubek et al., 2008)
pGEX4T-1 UmRac1 <sup>W56F</sup>	Amp	(Hlubek et al., 2008)
pGEX4T-1 HsCdc42	Amp	(Laborsammlung)
pGEX4T-1 HsRac1	Amp	(Laborsammlung)
pGEX4T-1 UmSte20	Amp	(Laborsammlung)
pGEX4T-1 UmDon1-DH	Amp	(Hlubek et al., 2008)
pGEX4T-1 UmCdc24-DH-PH	Amp	(Schink, 2010)
pMF-1H	Amp, Hyg ( <i>U. maydis</i> )	(Brachmann et al., 2004)
pMF-1N	Amp, Nat ( <i>U. maydis</i> )	(Brachmann et al., 2004)
pMF2-1H	Amp, Hyg ( <i>U. maydis</i> )	(Brachmann et al., 2004)
pMF2-1N	Amp, Nat ( <i>U. maydis</i> )	(Brachmann et al., 2004)
pMF5-1H	Amp, Hyg ( <i>U. maydis</i> )	(Brachmann et al., 2004)
pMF5-1N	Amp, Nat ( <i>U. maydis</i> )	(Brachmann et al., 2004)
pHA(Hyg)	Amp, Hyg ( <i>U. maydis</i> )	Daniel Lanvert, pers. Mitteilung

## 4.2.2 In dieser Arbeit hergestellten Stämme

Stamm	Genutzte Plasmide	Resistenz	Ausgangsstamm
Bub8 $\Delta hot1$	pJet1.2- $\Delta hot1$ (Hyg)	Hyg <sup>R</sup>	Bub8
Bub8don1 $\Delta hot1$	pJet1.2- $\Delta hot1$ (Hyg)	Hyg <sup>R</sup>	Bub8don1
Bub8 Hot1-GFP	pRS426-hot1-GFP (Hyg)	Hyg <sup>R</sup>	Bub8
Bub8 Pcrp::hot1	pJet1.2-Pcrp::hot1 (Hyg)	Hyg <sup>R</sup>	Bub8
Bub8 Pcrp::hot1	pJet1.2-Pcrp::hot1 (Nat)	Nat <sup>R</sup>	Bub8
Bub8 Pcrp::Hot1-GFP	pJet1.2-Pcrp::hot1 (Nat)	Hyg <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>	Bub8 Hot1-GFP
Bub8 Pcrp::Hot1-GFP Petef::Cdc10	p123 Cdc10-RFP	Hyg <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	Bub8 Pcrp::Hot1-GFP
Bub8 Pcrp::Hot1-GFP Petef::Cdc10	p123 lifeact-3xRFP	Hyg <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	Bub8 Pcrp::Hot1-GFP
Bub8don1 Pcrp::Hot1-DH-BAR	pCRG-Hot1 <sub>DH-BAR</sub> -GFP	Cbx <sup>R</sup>	Bub8don1
Bub8don1 Pcrp::Hot1	pJet1.2-Pcrp::hot1 (Hyg)	Hyg <sup>R</sup>	Bub8don1
Bub8don1 Pcrp::Don1 <sub>DH</sub> (Hot1)-GFP	pCRG-Don1 <sub>DH</sub> (Hot1)-GFP	Cbx <sup>R</sup>	Bub8 don1
Bub8don1 Pcrp::Don1 <sub>DH-BAR</sub> (Hot1)-GFP	pCRG-Don1 <sub>DH-BAR</sub> (Hot1)-GFP	Cbx <sup>R</sup>	Bub8don1
Bub8 Don1 <sub>DH</sub> (Hot1)-GFP	pRS426-Don1 <sub>DH</sub> (Hot1)-GFP	Hyg <sup>R</sup>	Bub8don1
Bub8 $\Delta hob1$	pRS426- $\Delta hob1$ (Hyg)	Hyg <sup>R</sup>	Bub8
Bub8 $\Delta hob3$	pRS426- $\Delta hob3$ (Nat)	Nat <sup>R</sup>	Bub8
Bub8 Hob1-GFP	pRS426-Hob1-GFP (Hyg)	Hyg <sup>R</sup>	Bub8
Bub8 Hob3-GFP	pRS426-Hob3-GFP (Hyg)	Hyg <sup>R</sup>	Bub8
Bub8Pcrp::hot1 Petef::GFP-Cdc42	pETEF-GFP-Cdc42	Hyg <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	Bub8 Pcrp::hot1
Bub8Pcrp::hot1 Petef::GFP-Cdc42 <sup>F56W</sup>	pETEF-GFP-Cdc42 <sup>F56W</sup>	Hyg <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	Bub8 Pcrp::hot1
Bub8Pcrp::hot1 Petef::GFP-Rac1	pETEF-GFP-Rac1	Hyg <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	Bub8 Pcrp::hot1
Bub8Pcrp::hot1 Petef::GFP-Rac1 <sup>W56F</sup>	pETEF-GFP-Rac1 <sup>W56F</sup>	Hyg <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	Bub8 Pcrp::hot1
Bub8Pcrp::hot1 Petef::GFP-C45R	pETEF-GFP-C45R	Hyg <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	Bub8 Pcrp::hot1
Bub8Pcrp::hot1 Petef::GFP-R45C	pETEF-GFP-R45C	Hyg <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	Bub8 Pcrp::hot1
Bub8Pcrp::hot1 Petef::GFP-C45R70C	pETEF-GFP-C45R70C	Hyg <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	Bub8 Pcrp::hot1
Bub8Pcrp::hot1 Petef::GFP-R45C70R	pETEF-GFP-R45C70R	Hyg <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	Bub8 Pcrp::hot1
Bub8 Hot1 <sup><math>\Delta</math>AA1216-1406</sup> -GFP	pRS426-hot1 <sup><math>\Delta</math>AA1216-1406</sup> -GFP	Hyg <sup>R</sup>	Bub8
Bub8 Pcrp::Hot1 <sup><math>\Delta</math>AA1216-1406</sup> -GFP	pRS426-hot1 <sup><math>\Delta</math>AA1216-1406</sup> -GFP	Hyg <sup>R</sup>	Bub8
Bub8 Hot1 <sup><math>\Delta</math>AA1216-1406</sup> -GFP			
Bub8Petef::GFP-Cdc42AA158-Ende	pETEF-GFP-Cdc42AA158-Ende	Cbx <sup>R</sup>	Bub8

#### 4 Material und Methoden

Bub8Petef::GFP- Cdc42AA158-Ende Petef::mKateRac1AA158- Ende	pMF-1H-pETEF-mKate- Rac1AA158-Ende	Cbx <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup>	Bub8	Petef::GFP- Cdc42AA158-Ende
AB31Petef::GFP- Cdc42AA158-Ende	pETEF-GFP-Cdc42AA158- Ende	Cbx <sup>R</sup>	AB31	
AB31Petef::GFP- Cdc42AA158-Ende Petef::mKateRac1AA158- Ende	pMF-1H-pETEF-mKate- Rac1AA158-Ende	Cbx <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup>	AB31	Petef::GFP- Cdc42AA158-Ende
AB31Petef::mKate-C157R	pETEF-mKate-C157R	Cbx <sup>R</sup>	AB31	
AB31Petef::mKateRac1	pETEF-mKate-Rac1	Cbx <sup>R</sup>	AB31	
AB31Petef::mKate-C157R Petef::GFP-Cdc42	pMF-1H-pETEF-GFP- Cdc42	Cbx <sup>R</sup>	AB31Petef::mKate-C157R	
AB31Petef::mKateRac1 Petef::GFP-Cdc42	pMF-1H-pETEF-GFP- Cdc42	Cbx <sup>R</sup>	AB31Petef::mKateRac1	
Bub8Δcdc42 Petef::GFP- C157R	pETEF-GFP-C157R	Hyg <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	Bub8Δcdc42	
Bub8Δcdc42 PcrG::GFP- C157R	pCRG-GFP-C157R	Hyg <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	Bub8Δcdc42	
Bub8Δrac1 Petef::GFP- C157R	pETEF-GFP-C157R	Nat <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	Bub8Δrac1	
Bub8Δrac1 PcrG::GFP- C157R	pCRG-GFP-C157R	Nat <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	Bub8Δrac1	
AB31Δcdc42 Petef::GFP- C157R	pETEF-GFP-C157R	Hyg <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	AB31Δcdc42	
AB31Δcdc42 PcrG::GFP- C157R	pCRG-GFP-C157R	Hyg <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	AB31Δcdc42	
AB31Δrac1 Petef::GFP- C157R	pETEF-GFP-C157R	Nat <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	AB31Δrac1	
AB31Δrac1 PcrG::GFP- C157R	pCRG-GFP-C157R	Nat <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	AB31Δrac1	
Bub8Δcdc42Δrac1 PcrG::GFP-C157R	pJet1.2Δrac1 (Nat)	Hyg <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>	Bub8Δcdc42	PcrG::GFP- C157R
Bub8Δcdc42 PcrG::GFP- Cdc42 <sup>F56W</sup>	pCRG-GFP-Cdc42 <sup>F56W</sup>	Hyg <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	Bub8Δcdc42	
Bub8Δrac1 PcrG::GFP- Cdc42 <sup>F56W</sup>	pCRG-GFP-Cdc42 <sup>F56W</sup>	Nat <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	Bub8Δrac1	
Bub8Δcdc42 PcrG::GFP- Rac1 <sup>W56F</sup>	pCRG-GFP-Rac1 <sup>W56F</sup>	Hyg <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	Bub8Δcdc42	
Bub8Δrac1 PcrG::GFP- Rac1 <sup>W56F</sup>	pCRG-GFP-Rac1 <sup>W56F</sup>	Nat <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	Bub8Δrac1	
Bub8Δcdc42 PcrG::GFP- C157R <sup>F56W</sup>	pCRG-GFP-C157R <sup>F56W</sup>	Hyg <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	Bub8Δcdc42	
Bub8Δrac1 PcrG::GFP- C157R <sup>F56W</sup>	pCRG-GFP-C157R <sup>F56W</sup>	Nat <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	Bub8Δrac1	
Bub8Δrac1 Petef::GFP- C157R <sup>F56W</sup>	pETEF-GFP-C157R <sup>F56W</sup>	Nat <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	Bub8Δrac1	
Bub8don1 PcrG::GFP- Cdc42 <sup>F56W</sup>	pCRG-GFP-Cdc42 <sup>F56W</sup>	Cbx <sup>R</sup>	Bub8don1	

#### 4 Material und Methoden

Bub8 <i>don1</i> Rac1 <sup>W56F</sup>	Pcrg::GFP-	pCRG-GFP-Rac1 <sup>W56F</sup>	Cbx <sup>R</sup>	Bub8 <i>don1</i>
Bub8 <i>don1</i> Cdc42 <sup>Q61L</sup>	Pcrg::GFP-	pRU11-Cdc42 <sup>Q61L</sup>	Cbx <sup>R</sup>	Bub8 <i>don1</i>
Bub8 <i>don1</i> Rac1 <sup>Q61L</sup>	Pcrg::GFP-	pRU11-Rac1 <sup>Q61L</sup>	Cbx <sup>R</sup>	Bub8 <i>don1</i>
Bub8 <i>don1</i> Cdc42 <sup>F56W Q61L</sup>	Pcrg::GFP-	pRU11 Cdc42 <sup>F56W Q61L</sup>	Cbx <sup>R</sup>	Bub8 <i>don1</i>
Bub8 <i>don1</i> Rac1 <sup>W56F Q61L</sup>	Pcrg::GFP-	pRU11 Rac1 <sup>W56F Q61L</sup>	Cbx <sup>R</sup>	Bub8 <i>don1</i>

### 4.2.3 Plasmide für die Transformation von *U. maydis*

#### pJet1.2- $\Delta$ *hot1* (Hyg)

Dieses Plasmid dient zur Generierung einer Deletionsmutante von *hot1*. Hierbei wurde der gesamte offene Leserahmen von *hot1* gegen eine Hygromycin-Resistenzkassette ersetzt.

##### Konstruktion

Primer linke Flanke:

MD827 Hot1 Deletion LF (5' SspI) for	gcataatattgaggccaagagtgcggggcgcac
MD828 Hot1 Deletion LF rev	gctagcggccatctaggccagatgattgagagattgtgaatcac

Primer rechte Flanke:

MD704 Hot1 Deletion RF for	gtgcggccgcattaataggcctgagtggccgatgtggcactgtgctctg
MD706 Hot1 Deletion RF (3' SspI) rev	gcggataacaatttcacacaggaaacagcaatattgtgcgcgaatgcgctg

Die Flanken wurden mittels PCR amplifiziert und zunächst die linke Flanke in den Vektor pJet1.2 ligiert. Der Vektor mit der linken Flanke wurde mit SmaI geöffnet und mit der rechten Flanke ligiert. Das resultierende Konstrukt wurde mit SfiI geöffnet und mit der SfiI-Kassette aus pMF1-H ligiert, die eine Hygromycin-Resistenzkassette enthält. Zur Transformation von *U. maydis* wurde das Konstrukt mit SspI ausgeschnitten.

#### pJet1.2-Pcrg::*hot1* (Hyg)/(Nat)

Dieses Plasmid dient zur Generierung einer konditionalen *hot1*-Deletion. Hierbei wird der endogene Hot1-Promotor durch den Arabinose/Glukose-regulierbaren *crg*-Promotor ersetzt. Als Selektionsmarker für *U. maydis* dient eine Hygromycin-Resistenz/Nourseothricin-Resistenz des Plasmids pMF2-1H/pMF2-1N.

##### Konstruktion

Primer linke Flanke:

MD827 Hot1 Konditional LF (5' SspI) for	gcataatattgaggccaagagtgcggggcgcac
MD828 Hot1 Konditional LF rev	gctagcggccatctaggccagatgattgagagattgtgaatcac

Primer rechte Flanke:

MD709 Hot1 Konditional RF for	caaaaaagataccataataggcctgagtggccatgccactgcgcacgctcag
MD710 Hot1 Konditional (3' SspI) rev	gcggataacaatttcacacaggaaacagcaatattggcgggaatggttcag

Die Flanken wurden mittels PCR amplifiziert und zunächst die linke Flanke in den Vektor pJet1.2 ligiert. Der Vektor mit der linken Flanke wurde mit SmaI geöffnet und mit der rechten Flanke ligiert. Das resultierende Konstrukt wurde mit SfiI geöffnet und mit der SfiI-Kassette aus pMF2-1H/pMF2-1N ligiert, die eine Hygromycin-Resistenzkassette/Nourseothricin-Resistenzkassette, sowie den *crg*-Promotor enthält. Zur Transformation von *U. maydis* wurde das Konstrukt mit SspI ausgeschnitten. Dies Plasmid wurde sowohl für die Erstellung einer konditionalen *hot1*-Mutante, als auch zu Überexpression der Hot1-GFP-Fusionsproteins am endogenen Lokus benutzt.

### **pRS426-*hot1*-GFP (Hyg)**

Dieses Plasmid dient zur Generierung einer C-terminalen GFP-Fusion von Hot1 am genomischen Lokus. Als Selektionsmarker für *U. maydis* dient die Hygromycin-Resistenz des Plasmids pMF5-1H.

#### Konstruktion

Primer linke Flanke:

MD711 Hot1 GFP LF (5' SspI) for	gtaacgccagggttttcccatcacgaggaatattaca- cagcagcatgagcg
MD712 Hot1 GFP LF rev	cccttgctcaccatggtggccgcttgccgcggacagaggt- caaaatttc
Primer rechte Flanke:	
MD713 Hot1 GFP RF for	gtgcccgcgcattaataggcctgagtgcccgatgtggcactgt- gctctg
MD714 Hot1 GFP RF (3' SspI) rev	gcggataacaatttcacacaggaaacagcaatattgcggcac- cagcaacgtatc

Die Flanken wurden mittels PCR amplifiziert. Die Flanken enthalten 30 bp lange Homologieregionen zum Vektor pRS426 beziehungsweise zur SfiI-Kassette. Die Flanken wurden zusammen mit der SfiI-Kassette aus pMF5-1H, die den offenen Leserahmen von GFP sowie eine Hygromycin-Resistenzkassette trägt und dem KpnI/BamHI geschnittenen Vektor pRS426 in *S. cerevisiae* eingebracht. Hier wurde über homologe Rekombination zwischen den Fragmenten und dem Vektor pRS426 das Plasmid pRS426-*hot1*-GFP generiert. Zur Transformation von *U. maydis* wurde das Konstrukt mit SspI ausgeschnitten.

### **pCRG-Hot1<sub>DH-BAR</sub>-GFP**

Dieses Plasmid dient zur Expression der Hot1<sub>DH-BAR</sub>-Domäne als C-terminale GFP-Fusion in *U. maydis*. Das Konstrukt wird unter der Kontrolle des Arabinose/Glukose-regulierbaren *crg*-Promotors exprimiert. Als Selektionsmarker in *U. maydis* dient die Carboxin-Resistenzkassette des Vektors pCRG-GFP-Ala6-MXN.

#### Konstruktion

MD859 Hot1 DH-BAR (EcoRI/BamHI) for	gatcgaattcggatccatgtggtcgatttcgcaagacgacttg
MD763 Hot1 DH-BAR (BamHI/NotI) rev	gcattgcccgcggatccgtgtaattggccaaagattttaac

Das DH-BAR Fragment von *hot1* wurde mittels PCR amplifiziert und in den Vektor pJet1.2 ligiert. Der entstehende Vektor wurde mit BamHI verdaut. Das entstehende Fragment der DH-BAR-Domäne von Hot1 wurde in den BamHI geöffneten Vektor pCRG-GFP-Ala6-MXN ligiert. Zur Transformation in *U. maydis* wurde das Plasmid mit SspI linearisiert.

#### **pCRG-Don1<sub>DH</sub>(Hot1)-GFP**

#### **pETEF-Don1<sub>DH</sub>(Hot1)-GFP**

Dieses Plasmid dient zur Expression von Don1<sub>DH</sub>(Hot1) als C-terminale GFP-Fusion in *U. maydis*. In diesem Konstrukt wurde die DH-Domäne von Don1 gegen die DH-Domäne von Hot1 ausgetauscht. Das Konstrukt wird unter der Kontrolle des Arabinose/Glukose-regulierbaren *cry*-Promotors beziehungsweise unter dem konstitutiv aktiven *etef*-Promotor exprimiert. Für eine Transformation in *U. maydis* wurde das Plasmid mit SspI linearisiert. Als Selektionsmarker in *U. maydis* dient die Carboxin-Resistenzkassette des Vektors pCRG-GFP-Ala6-MXN bzw. pETEF-GFP-Ala6-MXXN.

#### Konstruktion

MF236 Don1 N-Terminus (5'XmaI) for	gtaacgccagggttttccagtcacgacgcccg- gATGGCTTCCGCCTCCAGGCGA- GACTCTTCC
MF237 Don1 N-Terminus rev	CCTCTCTGTCTCCAGCAGCTCACGTAG- GATGCGTTTGGCGATGCGCGAAAAGAAG- CGACAG
MF238 Hot1 DH-Domäne for	CTGTGCGCTTCTTTTCGCGCATCGCAAA- CGCATCCTACGTGAGCTGCTGGAGACA- GAGAGG
MF239 Hot1 DH-Domäne rev	GGTGAGCACCATTTTCGTGCTGGC- GAACGTTCTCGTTAATGTTGTCCGC- TACCTTCTGAATC
MF240 Don1 C-Terminus mit PH-Domäne for	GATTCAGAAGGTAGCGGACAACATTAA- CGAGAACGTTTCGCCAGCACGAAATGGT- GCTCACC
MF241 Don1 C-Terminus mit PH-Domäne (3'XmaI) rev	gcggataacaatttcacacaggaaacagccc- cgggTTTGGAAGTGCTTTCGCCAATCG- CAGAGGC



Die einzelnen Fragmente wurden mittels PCR amplifiziert. Das N-Terminale Fragment träge am 5'Ende eine 30 bp Homologie Vektor pRS426 sowie am 3'Ende eine 30 bp Homologie zur DH-Domäne von Hot1. Die DH-Domäne von Hot1 trägt am 5'Ende eine 30 bp Homologie zum N-Terminus von Don1 bzw. am 3'Ende eine 30 bp Homologie zum C-Terminus von Don1. Der C-Terminus von Don1 trägt am 5'Ende eine 30 bp Homologie zur DH-Domäne von Hot1 und am 3'Ende eine zum Vektor pRS426. Die einzelnen Fragmente wurden zusammen mit dem KpnI/BamHI geöffneten Vektor pRS426 in *S. cerevisiae* gebracht und über homologe Rekombination zwischen den Fragmenten und dem Vektor wurde das Konstrukt Don1<sub>DH</sub>(Hot1) generiert. Das entstandene Plasmid wurde mit XmaI verdaut und das Fragment Don1<sub>DH</sub>(Hot1) jeweils in den XmaI geöffneten Vektor pCRG-GFP-Ala6-MXN bzw. pETEF-GFP-Ala6-MXXN ligiert.

#### **pCRG-Don1<sub>DH-BAR</sub>(Hot1)-GFP**

#### **pETEF-Don1<sub>DH-BAR</sub>(Hot1)-GFP**

Dieses Plasmid dient zur Expression von Don1<sub>DH-BAR</sub>(Hot1) als C-terminale GFP-Fusion in *U. maydis*. Das Konstrukt wird unter der Kontrolle des Arabinose/Glukose-regulierbaren *crg*-Promotors beziehungsweise unter dem konstitutiv aktiven *etef*-Promotor exprimiert. Für eine Transformation in *U. maydis* wurde das Plasmid mit SspI linearisiert. Als Selektionsmarker in *U. maydis* dient die Carboxin-Resistenzkassette des Vektors pCRG-GFP-Ala6-MXN bzw. pETEF-GFP-Ala6-MXXN.

#### Konstruktion

MF236 Don1 N-Terminus (5'XmaI) for	gtaacgccagggttttccagtcacgacgcccg- gATGGCTTCCGCCTCCAGGCGA- GACTCTTCC
MF237 Don1 N-Terminus rev	CCTCTCTGTCTCCAGCAGCTCACGTAG- GATGCGTTTGCGATGCGCGAAAAGAAG- CGACAG
MF238 Hot1 DH-BAR-Domäne for	CTGTCGCTTCTTTTCGCGCATCGCAAA- CGCATCCTACGTGAGCTGCTGGAGACA- GAGAGG
MF243 Hot1 DH-BAR-Domäne rev	GTCGGCCTTCAACGTTTCGACGTGCAGA- CATTTCTTGCCAGAAACCGATGAGCG- CACGATG
MF242 Don1 C-Terminus ohne PH-Domäne for	CATCGTGCGCTCATCGGTTTCTGGCAA- GAAATGTCTGCACGTGCAACGTTGAAG- GCCGAC
MF241 Don1 C-Terminus ohne PH-Domäne (3'XmaI) rev	gcggataacaatttcacacaggaaacagccc- cgggTTTGGAAGTGCTTTCGCCAATCG- CAGAGGC

Die einzelnen Fragmente wurden mittels PCR amplifiziert. Das N-Terminale Fragment träge am 5'Ende eine 30 bp Homologie Vektor pRS426 sowie am 3'Ende eine 30 bp Homologie zur DH-BAR-Domäne von Hot1. Die DH-BAR-Domäne von Hot1 trägt am 5'Ende eine 30 bp Homologie zum N-Terminus von Don1 bzw. am 3'Ende eine 30 bp Homologie zum C-Terminus ohne PH-Domäne von Don1. Der C-Terminus ohne PH-Domäne von Don1 trägt am 5'Ende eine 30 bp Homologie zur DH-BAR-Domäne von Hot1 und am 3'Ende eine zum Vektor pRS426. Die einzelnen Fragmente wurden zusammen mit dem KpnI/BamHI geöffneten Vektor pRS426 in *S. cerevisiae* gebracht und über homologe Rekombination zwischen den Fragmenten und dem Vektor wurde das Konstrukt Don1<sub>DH-BAR</sub>(Hot1) generiert. Das entstandene Plasmid wurde mit XmaI verdaut und das Fragment Don1<sub>DH-BAR</sub>(Hot1) jeweils in den XmaI geöffneten Vektor pCRG-GFP-Ala6-MXN bzw. pETEF-GFP-Ala6-MXXN ligiert.

#### **pRS426-Don1<sub>DH</sub>(Hot1)-GFP**

#### **pETEF-Don1<sub>DH-BAR</sub>(Hot1)-GFP**

Dieses Plasmid dient zur Expression von Don1<sub>DH</sub>(Hot1) als C-terminale GFP-Fusion am endogenen Lokus von Don1 in *U. maydis*. Für eine Transformation in *U. maydis* wurde das Plasmid mit SspI linearisiert. Als Selektionsmarker in *U. maydis* dient die Hygromycin-Resistenzkassette des Vektors pMF5-2H.

#### Konstruktion

MF268 Don1 <sub>DH</sub> (Hot1)Don1 (5'SspI) for	gtaacgccagggttttccagtcacgacgaatat- tATGGCTTCCGCCTCCAGGCGA- GACTCTTC
MF269 Don1 <sub>DH</sub> (Hot1)Don1 rev	CCTTGCTCACCATGGTGGCCGCGTTGG- CCgcTTTGGAAGTGCTTTTCGCCAATCG- CAGAGG
MF270 Don1 1000bp nach ORF for	GTGCGGCCGCATTAATAGGCCT- GAGTGGCCATGCTCGCAAGTCATGT- GCTATCTGTCAG
MF271 Don1 1000bp nach ORF (3'SspI) rev	gcggataacaatttcacacaggaaacagcAATATTGA- GAGTCCAAGTCTCCTTGAGGAGGAG

Die einzelnen Fragmente wurden mittels PCR amplifiziert. Das Don1<sub>DH</sub>(Hot1) Fragment träge am 5'Ende eine 30 bp Homologie Vektor pRS426 sowie am 3'Ende eine 30 bp Homologie SfiI-Kassette des Vektors pMF5-2H, die neben der Hygromycin-Resistenzkassette den offenen Leserahmen von GFP enthält. Das Fragment der 1000 bp hinter dem offenen Leserahmen von Don1 trägt am 5'Ende eine 30 bp Homologie zur SfiI-Kassette von pMF5-2H und am 3'Ende eine 30 bp Homologie zum Vektor pRS426. Die einzelnen Fragmente, sowie die SfiI-Kassette von pMF5-2H, wurden zusammen mit dem KpnI/BamHI geöffneten Vektor pRS426 in *S. cerevisiae* gebracht. Über homologe Rekombination zwischen den Fragmenten und dem Vektor wurde das Konstrukt Don1<sub>DH</sub>(Hot1)-GFP (Hyg) generiert.

### **pRS426- $\Delta$ *hob3*(Nat)**

Dieses Plasmid dient zur Generierung Deletionsmutante von *hob3*. Hierbei wird der gesamte offene Leserahmen von *hob3* gegen eine Nourseothricin-Resistenzkassette ersetzt.

#### Konstruktion

Primer linke Flanke:

MD912 Hob3 Deletion LF (5' SspI) for	gtaacgccagggttttccagtcacgacgaatatt- gctgttgagttgggcg
MD913 Hob3 Deletion LF rev	caattgtcacgcatggtggccatctaggccggtgacgagctac- tagactaac

Primer rechte Flanke:

MD914 Hob3 Deletion RF for	cggccgcattaataggcctgagtggccttcgttcggacacagt- cggctg
MD915 Hob3 Deletion RF (3' SspI) rev	gcggataacaatttcacacaggaaacagcaatattggcggc- caatgcagccatc

Die Flanken wurden mittels PCR amplifiziert. Die Flanken enthalten 30 bp lange Homologieregionen zum Vektor pRS426 beziehungsweise zur SfiI-Kassette des Vektors pMF1-N. Die Flanken wurden zusammen mit der SfiI-Kassettedie, die eine Nourseothricin-Resistenzkassette trägt, und dem KpnI/BamHI geschnitten Vektor pRS426 in *S.cerevisiae* eingebracht. Hier wurde über homologe Rekombination zwischen den Fragmenten und dem Vektor pRS426 das Plasmid pRS426- $\Delta$ *hob3* generiert. Zur Transformation von *U. maydis* wurde das Konstrukt mit SspI ausgeschnitten.

### **pRS426- $\Delta$ *hob1*(Hyg)**

Dieses Plasmid dient zur Generierung Deletionsmutante von *hob1*. Hierbei wird der gesamte offene Leserahmen von *hob1* gegen eine Hygromycin-Resistenzkassette ersetzt.

#### Konstruktion

Primer linke Flanke:

MD912 Hob1 Deletion LF (5' SspI) for	gtaacgccagggttttccagtcacgacgaatatttattcgtgc- cagagacgc
MD913 Hob1 Deletion LF rev	caattgtcacgcatggtggccatctaggccggtgggc- caagctttgtgtgagg

Primer rechte Flanke:

MD914 Hob1 Deletion RF for	gcgtgcccgcattaataggcctgagtggccgatccaaccc- cgtccagac
MD915 Hob1 Deletion RF (3' SspI) rev	gcggataacaatttcacacaggaaacagcaatattagaagaa- gaggaagac

Die Flanken wurden mittels PCR amplifiziert. Die Flanken enthalten 30 bp lange Homologieregionen zum Vektor pRS426 beziehungsweise zur SfiI-Kassette des Vektors pMF1-H. Die Flanken wurden zusammen mit der SfiI-Kassettedie, die eine Hygromycin-Resistenzkassette trägt, und dem KpnI/BamHI geschnitten Vektor pRS426 in *S.cerevisiae* eingebracht. Hier wurde über homologe Rekombination zwischen den Fragmenten und dem Vektor pRS426 das Plasmid pRS426- $\Delta$ *hob1* generiert. Zur Transformation von *U. maydis* wurde das Konstrukt mit SspI ausgeschnitten.

### **pRS426-*hob3*-GFP**

Dieses Plasmid dient zur Generierung einer C-terminalen GFP-Fusion von Hob3 am genomischen Locus. Als Selektionsmarker für *U. maydis* dient die Hygromycin-Resistenz des Plasmids pMF5-1H.

#### Konstruktion

Primer linke Flanke:

ME840 Hob3 GFP LF (5' SspI) for

gtaacgccagggttttccagtcacgacgaatATTCGGG-  
CCGCCTCGTGCCTGTCTCTC

MD841 Hob3 GFP LF rev

CCCTTGCTCACCATGGTGGCCG-  
CGTTGGCCgcCTGACCTATACCGCA-  
GATGGACAGCTC

Primer rechte Flanke:

ME842 Hob3 GFP RF for

GTGCGGCCGCGATTAATAGGCCT-  
GAGTGGCCTTCGTTTCGGACACAGT-  
CGGCTGCATCTAG

ME843 Hob3 GFP RF (3' SspI) rev

gcggataacaatttcacacaggaaacagcaatATTGGCG-  
GCCAATGCAGCCATCAAGCGTG

Die Flanken wurden mittels PCR amplifiziert. Die Flanken enthalten 30 bp lange Homologieregionen zum Vektor pRS426 beziehungsweise zur SfiI-Kassette. Die Flanken wurden zusammen mit der SfiI-Kassette aus pMF5-1H, die den offenen Leserahmen von GFP sowie eine Hygromycin-Resistenzkassette trägt und dem KpnI/BamHI geschnitten Vektor pRS426 in *S.cerevisiae* eingebracht. Hier wurde über homologe Rekombination zwischen den Fragmenten und dem Vektor pRS426 das Plasmid pRS426-*hob3*-GFP generiert. Zur Transformation von *U. maydis* wurde das Konstrukt mit SspI ausgeschnitten.

### **pRS426-*hob1*-GFP**

Dieses Plasmid dient zur Generierung einer C-terminalen GFP-Fusion von Hob1 am genomischen Locus. Als Selektionsmarker für *U. maydis* dient die Hygromycin-Resistenz des Plasmids pMF5-1H.

#### Konstruktion

Primer linke Flanke:

Hob1 GFP LF (5' SspI) for

gtaacgccagggttttccagtcacgacgAA-  
TATTTTGGTCGTCACCTTGACACG  
CGCCCTTGCTCACCATGGTGGCCG-  
CGTTGGCCgcCTCGTCCCTGACG-  
TAGTTTCC

Hob1 GFP LF rev

Primer rechte Flanke:

Hob1 GFP RF for

CTGTGCGGCCGCATTAATAGGCCT-  
GAGTGGCCCGATCCAACCCCGTCCAGAC

Hob1 GFP RF (3' SspI) rev

gcggataacaatttcacacaggaaacagcaatATTAGAA-  
GAAGAGGAAGACGACG

Die Flanken wurden mittels PCR amplifiziert. Die Flanken enthalten 30 bp lange Homologieregionen zum Vektor pRS426 beziehungsweise zur SfiI-Kassette. Die Flanken wurden zusammen mit der SfiI-Kassette aus pMF5-1H, die den offenen Leserahmen von GFP sowie eine Hygromycin-Resistenzkassette trägt, und dem KpnI/BamHI geschnitten Vektor pRS426 in *S. cerevisiae* eingebracht. Hier wurde über homologe Rekombination zwischen den Fragmenten und dem Vektor pRS426 das Plasmid pRS426-*hob1*-GFP generiert. Zur Transformation von *U. maydis* wurde das Konstrukt mit SspI ausgeschnitten.

### **pETEF-GFP-Cdc42, pETEF-GFP-Cdc42<sup>F56W</sup>, pETEF-GFP-C45R, pETEF-GFP-C45R70C**

Diese Plasmid dient zur Generierung einer N-terminalen GFP-Fusion der verschiedenen aufgelisteten GTPasen. Die GTPasen werden hierbei unter der Kontrolle des konstitutiv aktiven *etef*-Promotors exprimiert. Als Selektionsmarker für *U. maydis* dient die Carboxin-Resistenzkassette des Plasmids pETEF-GFP-Ala6-MXXN.

#### Konstruktion

MB758 Cdc42 ORF (5' MluI) for

CACGCGTGATGCAGACCAT-  
CAAGTGTGTC

MG078 Cdc42 ORF (3' NotI) rev

GATCgcggccgcTCAGAGAATGGCG-  
CACTTGGAC

Die verschiedenen Fragmente wurden mittels PCR amplifiziert. Als Template diente jeweils die PGEX4-T-1 Plasmide der verschiedenen GTPasen (siehe unten). Zur Transformation von *U. maydis* wurde das Konstrukt mit SspI ausgeschnitten.

**pETEF-GFP-Rac1<sup>W56F</sup>, pETEF-GFP-R45C, pETEF-GFP-R45C70R**

Diese Plasmid dient zur Generierung einer N-terminalen GFP-Fusion der verschiedenen aufgelisteten GTPasen. Die GTPasen werden hierbei unter der Kontrolle des konstitutiv aktiven *etef*-Promotors exprimiert. Als Selektionsmarker für *U. maydis* dient die Carboxin-Resistenzkassette des Plasmids pETEF-GFP-Ala6-MXXN.

Konstruktion

MB758 Rac1 ORF (5' MluI) for	CACGCGTGATGCAGACCAT- CAAGTGTGTC
MG079 Rac1 ORF (3' NotI) rev	GATCgcgccgcTTAAAGAATCATA- CAGTTGTTC

Die verschiedenen Fragmente wurden mittels PCR amplifiziert. Als Template diente jeweils die PGEX4-T-1 Plasmide der verschiedenen GTPasen (siehe unten). Zur Transformation von *U. maydis* wurde das Konstrukt mit SspI ausgeschnitten.

**pCRG-GFP-Cdc42<sup>F56W</sup>, pCRG-GFP-Rac1<sup>W56F</sup>**

Diese Plasmid dient zur Generierung einer N-terminalen GFP-Fusion der beiden Punktmutanten von Cdc42 und Rac1. Die GTPasen werden hierbei unter der Kontrolle des konstitutiv aktiven *etef*-Promotors exprimiert. Als Selektionsmarker für *U. maydis* dient die Carboxin-Resistenzkassette des Plasmids pCRG-GFP-Ala6-MXN.

Konstruktion

MB758 Cdc42/Rac1 ORF (5' MluI) for	CACGCGTGATGCAGACCAT- CAAGTGTGTC
MG078 Cdc42 ORF (3' NotI) rev	GATCgcgccgcTCAGAGAATGGCG- CACTTGGAC
MG079 Rac1 ORF (3' NotI) rev	GATCgcgccgcTTAAAGAATCATA- CAGTTGTTC

Die verschiedenen Fragmente wurden mittels PCR amplifiziert. Als Template diente jeweils die PGEX4-T-1 Plasmide Punktmutanten der GTPasen (Laborsammlung). Zur Transformation von *U. maydis* wurde das Konstrukt mit SspI ausgeschnitten.

**pCRG-GFP-C157R, pETEF-GFP-C157R, pCRG-GFP-C157R<sup>F56W</sup>, pETEF-GFP-C157R<sup>F56W</sup>**

Diese Plasmid dient zur Generierung einer N-terminalen GFP-Fusion der beiden Punktmutanten chimären GTPase C157R und der Punktmutanten C157R<sup>F56W</sup>. Die GTPasen werden hierbei unter der Kontrolle des Arabinose/Glukose-regulierbaren *crg*-Promotors bzw. des konstitutiv aktiven *etef*-Promotors exprimiert. Als Selektionsmarker für *U. maydis* dient die Carboxin-Resistenzkassette des Plasmids pCRG-GFP-Ala6-MXN bzw. des Plasmids pETEF-GFP-Ala6-MXXN.

Konstruktion

MB758 Cdc42/Rac1 ORF (5' MluI) for	CACGCGTGATGCAGACCAT- CAAGTGTGTC
------------------------------------	------------------------------------

MG079 Rac1 ORF (3'NotI) rev

GATCgcgccgcTTAAAGAATCATA-  
CAGTTGTTC

Die verschiedenen Fragmente wurden mittels PCR amplifiziert. Als Template diente jeweils die PGEX4-T-1 Plasmide der chimären GTPasen bzw. deren Punktmutante (siehe unten, Plasmide *E. coli*). Zur Transformation von *U. maydis* wurde das Konstrukt mit SspI ausgeschnitten.

#### **pRS426-*hot1*<sup>ΔAA1216-1406</sup>-GFP**

Dieses Plasmid dient zur Generierung der Deletion der Insertionsregion innerhalb der DH-Domäne von Hot1 sowie einer C-terminalen GFP-Fusion des resultierenden Gens am genomischen Locus. Als Selektionsmarker für *U. maydis* dient die Hygromycin-Resistenz des Plasmids pMF5-1H.

##### Konstruktion

Primer N-terminale Region vor der Insertion:

MF866 (5'SspI) for

gtaacgccagggttttccagtcacgacgaatATTT-  
GCTTGATCACTCTGATAACCGCTCAC  
GCGCGTCGGCCGATCCAGCTGCAAGGC-  
CGTCGGCTCTCATCTTTGCTCTTGCCA-  
GATAGATATC

MF867

Primer C-terminale Region nach der Insertion:

MF868 for

GATATCTATCTGGCAAGAGCAAAGATGA-  
GAGCCGACGGCCTTGACAGCTGGATCGG-  
CCGACGCGC

MD712 (3'SspI) rev

cccttgctcaccatgggtggccgcgttggccgcggacagaggta-  
caaaattttc

Primer rechte Flanke:

MD713 for

gtgcggccgcattaataggcctgagtgccggatgtggcactgt-  
gctctg

MD714 RF (3'SspI) rev

gcggataacaatttcacacaggaaacagcaatattgcggcac-  
cagcaacgtatc

Die Fragmente wurden mittels PCR amplifiziert. Das N-terminale Fragment enthält eine 30 bp Homologieregion zum Vektor pRS426 und zum C-terminalen Fragment. Das C-terminale Fragment enthält eine 30 bp Homologieregion zum N-terminalen Fragment zur SfiI-Kassette. Die rechte Flanke enthält eine 30 bp Homologieregion zur SfiI-Kassette sowie zum Vektor pRS426. Die einzelnen Fragmente wurden zusammen mit der SfiI-Kassette aus pMF5-1H, die den offenen Leserahmen von GFP sowie eine Hygromycin-Resistenzkassette trägt und dem KpnI/BamHI geschnitten Vektor pRS426 in *S.cerevisiae* eingebracht. Hier wurde über homologe Rekombination zwischen den Fragmenten und dem Vektor pRS426 das Plasmid pRS426-*hot1*-GFP generiert. Zur Transformation von *U. maydis* wurde das Konstrukt mit SspI ausgeschnitten.

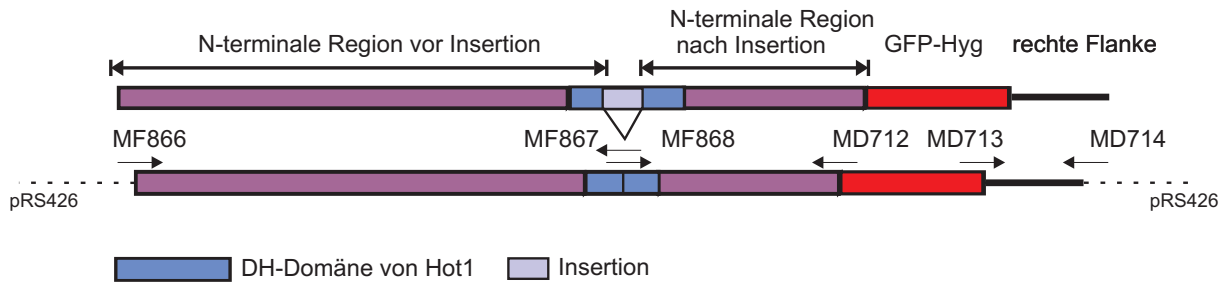


Abbildung 4.1: **Konstruktion der Deletion der Insertionsregion innerhalb der katalytischen Domäne von Hot1.**

### **pETEF-mKate-Rac1**

Diese Plasmid dient zur Expression einer N-terminalen GFP-Fusion der GTPase Rac1 unter Kontrolle des konstitutiven *etef*-Promotors. Das Plasmid wird ektopisch in *ip*-Lokus von *U. maydis* integriert, als Selektionsmarker für *U. maydis* dient die Carboxin-Resistenzkassette des Plasmids pETEF-mKate-Ala6-MXXN.

#### Konstruktion

MB758 Cdc42/Rac1 ORF (5' MluI) for	CACGCGTGATGCAGACCAT- CAAGTGTGTC
MG079 Rac1 ORF (3' NotI) rev	GATCgcggccgcTTAAAGAATCATA- CAGTTGTTC

Der offene Leserahmen von Rac1 wurden mittels PCR amplifiziert und mit Restriktionsenzymen MluI und NotI verdaut. Das so behandelte Fragment wurde mit dem MluI und NotI geöffneten Vektor pETEF-mKate-Ala6-MXXN ligiert. Zur Transformation von *U. maydis* wurde das Konstrukt mit SspI ausgeschnitten.

### **pETEF-mKate-C157R**

Diese Plasmid dient zur Expression einer N-terminalen GFP-Fusion der chimären GTPase C157R unter Kontrolle des konstitutiven *etef*-Promotors. Das Plasmid wird ektopisch in *ip*-Lokus von *U. maydis* integriert. Als Selektionsmarker für *U. maydis* dient die Carboxin-Resistenzkassette des Plasmids pETEF-mKate-Ala6-MXXN.

#### Konstruktion

MB758 Cdc42/Rac1 ORF (5' MluI) for	CACGCGTGATGCAGACCAT- CAAGTGTGTC
MG079 Rac1 ORF (3' NotI) rev	GATCgcggccgcTTAAAGAATCATA- CAGTTGTTC

Die chimäre GTPase C157R wurden mittels PCR amplifiziert (als Template diente das Plasmid pGEX4T-1-C157R, siehe unten) und mit Restriktionsenzymen MluI und NotI verdaut. Das so behandelte Fragment wurde mit dem MluI und NotI geöffneten Vektor pETEF-mKate-Ala6-MXXN ligiert. Zur Transformation von *U. maydis* wurde das Konstrukt mit SspI ausgeschnitten.



### **pMF1H-*etef*-GFP-Cdc42**

Dieses Plasmid dient zur Expression einer GFP-Fusion der GTPase Cdc42 unter Kontrolle des konstitutiv aktiven *etef*-Promotors. Das Plasmid wird ektopisch in das Genom von *U. maydis* integriert. Als Selektionsmarker dient die Hygromycin-Resistenz des Plasmids pMF1H.

#### Konstruktion

Das Plasmid pETEF-GFP-Cdc42 wurde mit den Restriktionsenzymen PvuII und EcoRV geschnitten. Hierdurch wurde ein Fragment gewonnen, dass den *etef*-Promotor sowie die offenen Leserahmen von GFP und Cdc42 enthält. Dieses Fragment wurde anschließend in den mit MscI geöffneten Vektor pMF1H ligiert. Das resultierende Plasmid pMF1H-*etef*-GFP-Cdc42 wurde vor der Transformation von *U. maydis* mit SspI linearisiert.

### **pETEF-mKate-Rac1AA158-Ende**

Diese Plasmid dient zur Expression einer N-terminalen mKate-Fusion der Aminosäuren 158-Ende der kleinen GTPase Rac1 unter Kontrolle des konstitutiven *etef*-Promotors. Das Plasmid wird ektopisch in *ip*-Lokus von *U. maydis* integriert. Als Selektionsmarker für *U. maydis* dient die Carboxin-Resistenzkassette des Plasmids pETEF-mKate-Ala6-MXXN.

#### Konstruktion

MB758 Cdc42/Rac1 ORF (5' MluI) for	gatcACGCGTgTCTGCACTCACCCA- GAAGGG
MG079 Rac1 ORF (3' NotI) rev	GATCgcgccgcTTAAAGAATCATA- CAGTTGTTC

Die Aminosäuren 158-Ende von Rac1 wurden mittels PCR amplifiziert und mit Restriktionsenzymen MluI und NotI verdaut. Das so behandelte Fragment wurde mit dem MluI und NotI geöffneten Vektor pETEF-mKate-Ala6-MXXN ligiert. Zur Transformation von *U. maydis* wurde das Konstrukt mit SspI ausgeschnitten.

### **pETEF-GFP-Cdc42AA158-Ende**

Diese Plasmid dient zur Expression einer N-terminalen GFP-Fusion der Aminosäuren 158-Ende der kleinen GTPase Cdc42 unter Kontrolle des konstitutiven *etef*-Promotors. Das Plasmid wird ektopisch in *ip*-Lokus von *U. maydis* integriert. Als Selektionsmarker für *U. maydis* dient die Carboxin-Resistenzkassette des Plasmids pETEF-GFP-Ala6-MXXN.

#### Konstruktion

MB758 Cdc42/Rac1 ORF (5' MluI) for	gatcACGCGTgTCGGCGCTGACG- CAAAAGGG
MG079 Rac1 ORF (3' NotI) rev	GATCgcgccgcTCAGAGAATGGCG- CACTTGG

Die Aminosäuren 158-Ende von Cdc42 wurden mittels PCR amplifiziert und mit Restriktionsenzymen MluI und NotI verdaut. Das so behandelte Fragment wurde mit dem MluI und NotI geöffneten Vektor pETEF-GFP-Ala6-MXXN ligiert. Zur Transformation von *U. maydis* wurde das Konstrukt mit SspI ausgeschnitten.

### **pMF1H-*etef*-mKate-Rac1AA158-Ende**

Dieses Plasmid dient zur Expression einer mKate-Fusion der Aminosäuren 158-Ende der GTPase Rac1 unter Kontrolle des konstitutiv aktiven *etef*-Promotors. Das Plasmid wird ektopisch in das Genom von *U. maydis* integriert. Als Selektionsmarker dient die Hygromycin-Resistenz des Plasmids pMF1H.

#### Konstruktion

Das Plasmid pETEF-mKate-Rac1AA158-Ende wurde mit den Restriktionsenzymen PvuII und EcoRV geschnitten. Hierdurch wurde ein Fragment gewonnen, dass den *etef*-Promotor sowie die offenen Leserahmen von GFP und die Aminosäuren 158-Ende von Rac1 enthält. Dieses Fragment wurde anschließend in den mit MscI geöffneten Vektor pMF1H ligiert. Das resultierende Plasmid pMF1H-pMF1H-*etef*-mKate-Rac1AA158-Ende wurde vor der Transformation von *U. maydis* mit SspI linearisiert.

### **pJet1.2- $\Delta$ *rac1* (Nat)**

Dieses Plasmid dient zur Generierung Deletionsmutante von *rac1*. Hierbei wird der gesamte offene Leserahmen von *rac1* gegen eine Nourseothricin-Resistenzkassette ersetzt.

#### Konstruktion

Primer linke Flanke:

MG504 Rac1 LF (5' SspI) for

GATCaatATTATTAAATCATGAATAAATG

MG505 Rac1 LF (3' SfiI) rev

gacGGCCATCTAGGCCGATTGCGAGTGT-  
GAATACGAG

Primer rechte Flanke:

MG506 Rac1 RF (3' SfiI) for

gacGGCCTGAGTGGCCGAGTGAAACGC-  
GAACACGCAG

MG507 Rac1 RF (3' SspI) rev

GATCaatATTCCACTCAAACCCCCTGAC

Die Flanken wurden mittels PCR amplifiziert. Die Flanken enthalten eine SfiI- Restriktions-schnittstelle und wurden mit SfiI verdaut. Die SfiI-Kassette des Vektors pMF1-N wurde zusammen mit den Flanken ligiert und auf das erhaltene Fragment wurde per PCR amplifiziert (MG504/MG507). Das Produkt wurde in den EcoRV geöffneten pJet1.2 Vektor ligiert. Zur Transformation von *U. maydis* wurde das Konstrukt mit SspI ausgeschnitten.

#### 4.2.4 Plasmide für die Produktion von rekombinanten Proteinen in *E. coli*

##### pGEX4T-1-chimäre GTPasen

Als Ausgangsplasmid diente das Plasmid pGEX4T-1-HsCdc42 aus der Laborsammlung. Zur Herstellung von pGEX4T-1-HsCdc42 wurde humanes Cdc42 mittels PCR amplifiziert, mit EcoRI und NotI verdaut und in den Vektor pGEX4T-1 (Amersham) ligiert. Durch die PCR wurde einen NdeI Restriktionsschnittstelle zwischen der EcoRI-Schnittstelle und dem offenen Leserahmen von Cdc42 eingeführt und wurde für weitere Konstruktionen verwendet. Der Vektor pGEX4T-1 dient zur Expression von Proteinen als GST-Fusionen in *E. coli*. Die Expression des jeweiligen Gens steht unter der Kontrolle des *tac*-Promotors, der durch Lactose oder IPTG stimuliert werden kann.

##### Konstruktion

MG908 NdeI for	GATCcatATGCAGACCATCAAGTGTGT
MG078 NotI rev	GATCgcggccgcTCAGAGAATGGCG- CACTTGGAC
MG079 NotI rev	GATCgcggccgcTTAAAGAATCATA- CAGTTGTTC
MF703 NotI rev	gcgataacaatttcacacaggaaacagcgccgcTCA- GAGAATGGCGCACTTGGACTTCTTGCG
MF699 NotI rev	gcgataacaatttcacacaggaaacagcgccgcT- TAAAGAATCATACAGTTGTTCTTCTTC
MB658 BtgI for	TCGGAGTATGTTCCACGGTGTTTGA- CAACTA
MB659 BtgI rev	TAGTTGTTCAAACACCGTGGAACA- TACTCCGA
MB660 AflII for	GCGACCGACTGCGACCCTTAAGTTACC- CGCAGACGGATG
MB661 AflII rev	CATCCGTCTGCGGGTAACTTAAGGGT- CGCAGTCGGTCGC
MB662 BglIII for	GTGGGAACCCAGGTAGATCTGCGCGAC- GACCAC
MB663 BglIII rev	GTGGTCGTGCGCGAGATC- TACCTGGGTTCAC
MB664 ApaLI for	CAAGTACGTGAGTGCAGTGCAC- GACGCAAAGGG
MB665 ApaLI rev	CCCTTTTTCGTCAGTGCAGTGCAC- GACGTACTTG
MB666 BtgI for	GAATACATCCCCACGGTGTTTGACAAC- TA
MB667 BtgI rev	TAGTTGTCAAACACCGTG- GATGTATTC

#### 4 Material und Methoden

MB668 AflII for	ACGACCGGTTAAGACCCTTAAGTTACC- CGCAAACCGACG
MB669 AflII rev	CGTCGGTTTGCGGGTAACT- TAAGGGTCTTAACCGGTCGT
MB670 BglII for	GTGGGAACCAAGTTAGATCTGCGCGAG- GA
MB671 BglII rev	TCCTCGCGCAGATCTAACTTGGTTCC- CAC
MB672 ApaLI for	AAGTATTTGGAGTGCAGTGCAGTACC- CAGAAGGGATT
MB673 ApaLI rev	AATCCCTTCTGGGTCAGTGCAGTG- CACTCCAAATACTT
MF697	GAGACCGAGAGAGACGGGTTTACCGT- CGACCATGACAGTCACGGCGTAGTTGT- CAAACAC
MF698	GTGTTTGACAACTACGCCGTGACTGT- CATGGTCGACGGTAAACCCGTCTCTCT- CGGTCTC
MG909	CCCGCAGTATCCCAGAGACCGAGAGA- GACCGGATCCTCGCCAATCATGACAGT- CACGG
MG910	CGGCAAACGTCATGGTCGACGGTAAAC- CCTACACACTCGGATTGTTGATACCGC- CGG
MF701	CAATCCGAGTGTGTACGGATCCTCGC- CAATCATGACGTTTGCCGAATAGTTGT- CAAACAC
MF702	GTGTTTGACAACTATTCGGCAAACGT- CATGATTGGCGAGGATCCGTACACACT- CGGATTG
MF911	CCGGCGGTATCGAACAATCC- GAGTGTGTAGGGTTTACCGTCGAC- CATGACGTTTGCCG
MF912	CCGTGACTGTCATGATTGGCGAGGATC- CGGTCTCTCTCGGTCTCTGGGATACTG- CGGG
C1	AACAAGTTTCCCTCGGAGTATGTTCC- GACAGTGTTTGACAACTATTCGGCAAA- CGTCATG
C2	CATGACGTTTGCCGAATAGTTGTCAAA- CACTGTGCGGAACATACTCCGAGG- GAAACTTGTT

C3	CAAGAAGACTACGACCGGTAAAGAC- CGCTCTCATACCCGCAGACGGATGTCTT- CCTGGTC
C4	GACCAGGAAGACATCCGTCTGCGGG- TATGAGAGCGGTCTTAACCGGTTCG- TAGTCTTCTTG
C5	AACGCCTTCCCGGGCGAATACATCC- CCACAGTGTTTGACAACTACGCCGT- GACTGTCATG
C6	CATGACAGTCACGGCGTAGTTGTCAAA- CACTGTGGGGATGTATTCGCCCGG- GAAGGCGTT
C7	CAGGAGGACTACGACCGACTGC- GACCGCTTTTCGTACCCGCAAACC- GACGTGTTCCCTCGTG
C8	CACGAGGAACACGTCGGTTTGCGGG- TACGAAAGCGGTTCGAGTCGGTTCG- TAGTCCTCCTG
FW1	GTACACACTCGGATTGTGGGATACCGC- CGGTCAGGAG
FW2	CTCCTGACCGGCGGTATCCCACAATCC- GAGTGTGTAC
WF1	CCCGTCTCTCTCGGTCTCTTTGATACTG- CGGGTCAAGAAG
WF2	CTTCTTGACCCGCAGTATCAAAGAGACC- GAGAGAGACGGG
MF349 Cdc42 K27A fw	ACCTGCCTGTTGATCTCGTACACCAC- CAAC <sub>gc</sub> GTTTCCCTCGGAGTATGTTCC- GACAGTGTTT
MF350 Cdc42 K27A rv	AAACACTGTTCGGAACATACTCCGAGG- GAAAC <sub>gc</sub> GTTGGTGGTGTACGAGATCAA- CAGGCAGGT
MF351 Cdc42 S30G fw	TTGATCTCGTACACCACCAACAAGTTTC- CC <sub>gg</sub> GGAGTATGTTCCGACAGTGTTTGA- CAACTAC
MF352 Cdc42 S30G rv	GTAGTTGTCAAACACTGT- CGGAACATACTCC <sub>cc</sub> GG- GAAACTTGTTGGTGGTGTACGAGATCAA
MF353 Cdc42 V33I fw	TACACCACCAACAAGTTTCCCTCGGAG- TAT <sub>a</sub> TTCC <sub>c</sub> AC <sub>g</sub> GTGTTTGACAACTACGC- CGTGACT

MF354 Cdc42 V33I rv	AGTCACGGCGTAGTTGTCAAA- CACcGTgGGAAtATACTCCGAGG- GAAACTTGTTGGTGGTGTGA
MF355 Rac1 A27K fw	ACGTGTCTTCTTATCTCGTATACAAC- gAACaagTTCCCGGGCGAATACATCCCCA- CAGTGT TT
MF356 Rac1 A27K rv	AAACACTGTGGGGATGTATTCGCCCCGG- GAActtGTTcGTTGTATACGAGATAAGAA- GACACGT
MF357 Rac1 G30A fw	CTTATCTCGTATACAACCAACGCCTTCC- CGaGCGAATACATCCCCACAGTGTTTGA- CAACTAT
MF358 Rac1 G30A rv	ATAGTTGTCAAACACTGTGGG- GATGTATTTCGcTCGGGAAGG- CGTTGGTTGTATACGAGATAAG
MF359 Rac1 I33V fw	TATACAACCAACGCCTTCCCGGGCGAA- TACgTtCCCACAGTGTTTGACAACCTATT- CGGCAAAC
MF360 Rac1 I33V rv	GTTTGCCGAATAGTTGTCAAA- CACTGTGGGgAcGTATTGCCCCGGGAAG- GCGTTGGTTGTATA

Zur Konstruktion der chimären GTPasen wurden verschiedene Strategien verwendet. Einige chimären GTPasen lagen bereits als fertige Konstrukte im Plasmid pBRIDGE vor (Hlubek et al., 2008). Diese Konstrukte dienten als Template und die chimäre GTPase wurden mittels PCR amplifiziert, mit NdeI und NotI verdaut und in den mit NdeI und NotI geöffneten Vektor pGEX4T-1 ligiert. Andere chimäre wurden mittels homologer Rekombination in Hefe generiert (siehe auch Drag and Drop). Dazu wurden die Primer jeweils so gewählt, dass sie an den Fragmentgrenzen 30 Nukleotide Überhang zum angrenzenden Fragment der korrespondierenden GTPase aufwiesen (vergleiche Abb. 4.2). Die jeweiligen Fragmente wurden mit Hilfe der PCR amplifiziert und zusammen mit dem KpnI/BamHI geöffneten Vektor pRS426 in Hefe transformiert und über homologe Rekombination die verschiedenen Plasmide generiert. Die so hergestellten Plasmide (pRS426-chimäre GTPase) wurden mit NdeI und NotI verdaut und in den mit NdeI und NotI geöffneten Vektor pGEX4T-1 ligiert. Für die Punktmutanten von Cdc42 und Rac1 wurde in die jeweilige GTPase mittels PCR die Punktmutation Cdc42 F56W und die Punktmutation Rac1 W56F eingefügt. Die mutierten GTPasen wurde per PCR amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen in den Vektor pGEX4T-1 ligiert. Nach dem gleichen Prinzip wurden die Punktmutationen Cda25 K27A, Cdc42 S30G, Cdc42 V33I, Rac1 A27K, Rac1 G30A und Rac1 I33V generiert. Für die Herstellung der Punktmutante der chimären GTPase C157R F56W diente die chimäre GTPase C157R als Template in der PCR.

#### 4 Material und Methoden

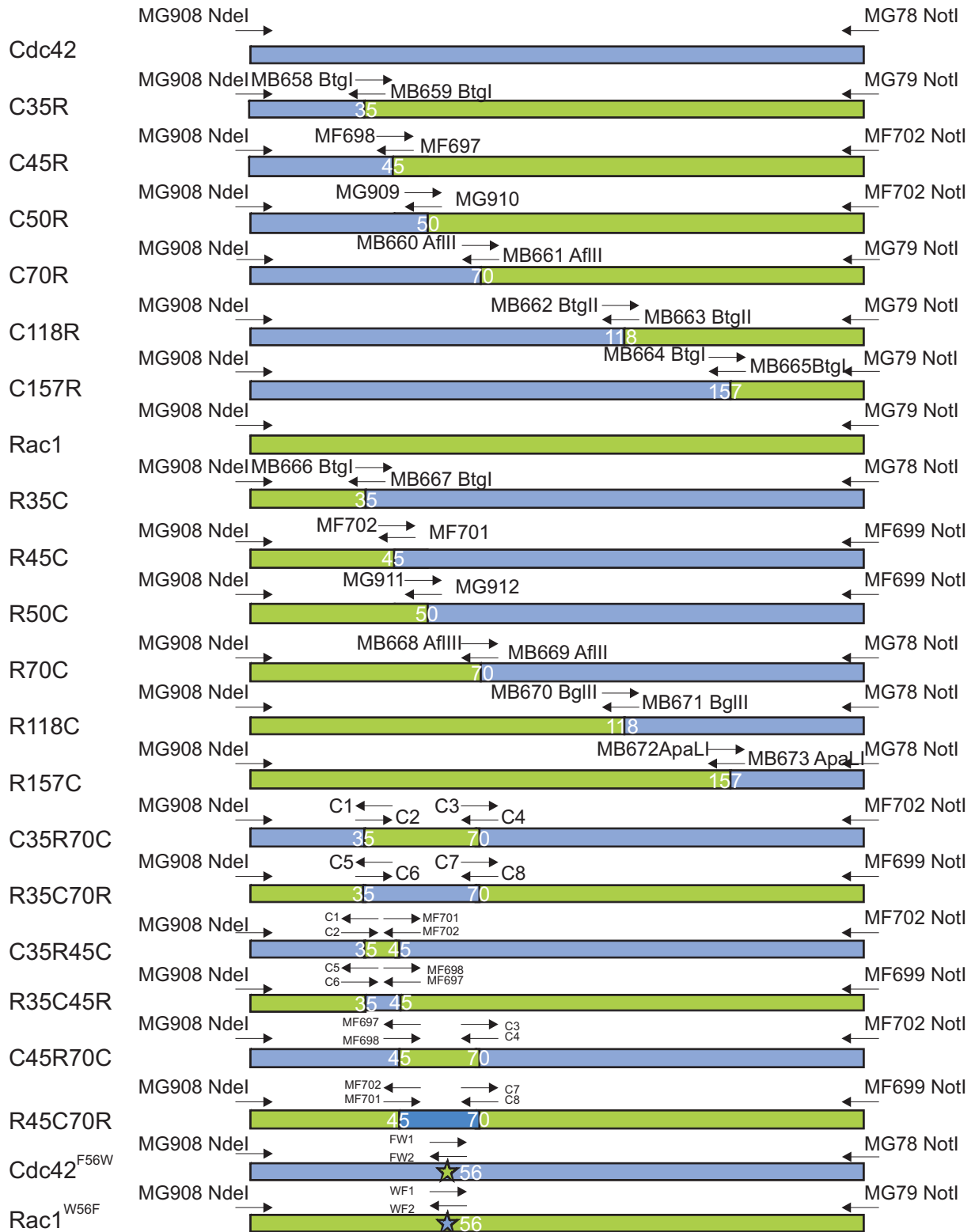


Abbildung 4.2: **Konstruktion der chimären GTPasen.** Fragmente der kleinen GTPase Cdc42 sind in blau dargestellt. Die Fragmente der kleinen GTPase Rac1 sind in grün dargestellt.

pGEX4T-1-Hot1-DH (+/-30AA)

Dieses Plasmid dient zur Expression der DH-Domäne von Hot1 als GST-Fusion in *E.coli*. Die Expression des Gens steht unter Kontrolle des *tac*-Promotors, der durch Lactose oder IPTG reguliert werden kann.

### Konstruktion

MF400 Hot1 DH +/- 30AA (5' NdeI) for	GATCcatatgTCTCGTAGTCCTAGCTTCAT- CC
MF401 Hot1 DH +/- 30AA (3' NotI) rev	gacGCGGCCGCttaGGTGGCACCGTGCTG- CATCCG

Die DH-Domäne von Hot1 wurde mittels PCR amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen NdeI und NotI in den NdeI/NotI geöffneten Vektor pGEX4T-1 ligiert.

### **pGEX4T-1-Hot1-DH<sup>ΔAA1216-1406</sup>**

Dieses Plasmid dient zur Expression der DH-Domäne von Hot1, in der die Insertionsregion deletiert wurde, als GST-Fusion in *E.coli*. Die Expression des Gens steht unter Kontrolle des *tac*-Promotors, der durch Lactose oder IPTG reguliert werden kann.

### Konstruktion

MF400 Hot1 DH +/- 30AA (5' NdeI) for	GATCcatatgTCTCGTAGTCCTAGCTTCAT- CC
MF401 Hot1 DH +/- 30AA (3' NotI) rev	gacGCGGCCGCttaGGTGGCACCGTGCTG- CATCCG

Die DH-Domäne von Hot1, in der die Insertionsregion deletiert wurde, wurde mittels PCR amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen NdeI und NotI in den NdeI/NotI geöffneten Vektor pGEX4T-1 ligiert. Als Template für die PCR diente das Plasmid pRS426-*hot1*<sup>ΔAA1216-1406</sup>.

### **pGEX4T-1-Hot1-DH (für die Kristallisationsversuche)**

Dieses Plasmid dient zur Expression der DH-Domäne von Hot1 als GST-Fusion in *E.coli*. Die Expression des Gens steht unter Kontrolle des *tac*-Promotors, der durch Lactose oder IPTG reguliert werden kann.

### Konstruktion

MG500 Hot1 DH (5' NdeI) for	GATCcatatgGAGCACAAGCGGCTCGT- CAAAC
MG501 Hot1 DH (3' NotI) rev	gacGCGGCCGCttaGGTGGCACCGTGCTG- CATCCG

Die DH-Domäne von Hot1 wurde mittels PCR amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen NdeI und NotI in den NdeI/NotI geöffneten Vektor pGEX4T-1 ligiert. In diesem Plasmid wurden die Domänengrenzen etwas anders gewählt, als in dem Plasmid pGEX4T-1-Hot1-DH (+/-30AA).



### **pGEX4T-1-TUBA-DH (+/-30AA)**

Dieses Plasmid dient zur Expression der DH-Domäne von TUBA als GST-Fusion in *E.coli*. Die Expression des Gens steht unter Kontrolle des *tac*-Promotors, der durch Lactose oder IPTG reguliert werden kann.

#### Konstruktion

MG374 TUBA DH +/- 30AA (5'NdeI) for gcatCATATGatagaagaacttcttcagacag

MG375 TUBA DH +/- 30AA (3'NotI) rev gcatCATATGatagaagaacttcttcagacag

Die DH-Domäne von TUBA wurde mittels PCR amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen NdeI und NotI in den NdeI/NotI geöffneten Vektor pGEX4T-1 ligiert.

### **pGEX4T-1-HsCdc42 F56W**

Dieses Plasmid dient zur Expression der mutierten GTPase HsCdc42 als GST-Fusion in *E.coli*. Die Expression des Gens steht unter Kontrolle des *tac*-Promotors, der durch Lactose oder IPTG reguliert werden kann.

#### Konstruktion

MG663 (5'NdeI) for gtaacgccagggttttccagtcacgacgcatatgcagacaat-  
taagtgtgtgtgtgtgggc

MG666 (3'NotI) rev gcggataacaatttcacacaggaaacagcgcgccgctcatag-  
cagcacacacctgcggctcttcttc

MG659 (F56W) for gattggtggagaaccatatactcttgactttgggatactg-  
cagggaagaggattatgacag

MG660 (F56W) rev ctgtcataatcctcttgccctgcagtatcccaaagtccaagagta-  
tatggttctccaccaatc

In die kleine GTPase HsCdc42 wurde mittels PCR die Punktmutation F56W eingefügt. Die mutierte GTPase wurde per PCR amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen NdeI und NotI in den NdeI/NotI geöffneten Vektor pGEX4T-1 ligiert.

### **pGEX4T-1-HsRac1 W56F**

Dieses Plasmid dient zur Expression der mutierten GTPase HsCdc42 als GST-Fusion in *E.coli*. Die Expression des Gens steht unter Kontrolle des *tac*-Promotors, der durch Lactose oder IPTG reguliert werden kann.

#### Konstruktion

MG667 (5'NdeI) for gtaacgccagggttttccagtcacgacgcatatgcaggccat-  
caagtgtgtgtgtgtg

MG670 (3'NotI) rev gcggataacaatttcacacaggaaacagcgcgccgcttacaa-  
cagcaggcattttctcttctcttc

MG661 (F56W) for gtagatggaaaaccggtgaatctgggcttattcgata-  
cagctggacaagaagattatgacag

MG662 (F56W) rev ctgtcataatcttctgtccagctgtatcgaataagcccagatt-  
caccggttttccatctac

In die kleine GTPase HsRac1 wurde mittels PCR die Punktmutation W56F eingefügt. Die mutierte GTPase wurde per PCR amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen NdeI und NotI in den NdeI/NotI geöffneten Vektor pGEX4T-1 ligiert.

### **pGEX4T-1-C157R F56W**

Dieses Plasmid dient zur Expression der mutierten GTPase C157R als GST-Fusion in *E.coli*. Die Expression des Gens steht unter Kontrolle des *tac*-Promotors, der durch Lactose oder IPTG reguliert werden kann.

#### Konstruktion

MG908 NdeI for	GATCcatATGCAGACCATCAAGTGTGT
MG079 NotI rev	GATCgcggccgcTTAAAGAATCATA- CAGTTGTTC
FW1	GTACACACTCGGATTGTGGGATACCGC- CGGTCAGGAG
FW2	CTCCTGACCGGCGGTATCCCACAATCC- GAGTGTGTAC

In die chimäre GTPase C157R wurde mittels PCR die Punktmutation F56W eingefügt. Als Template diente der Vektor pGEX-4T-1-C157R. Die mutierte GTPase wurde per PCR amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen NdeI und NotI in den NdeI/NotI geöffneten Vektor pGEX4T-1 ligiert.

### **pGEX4T-1-Hot1-BAR (+/-30AA)**

Dieses Plasmid dient zur Expression der BAR-Domäne von Hot1 als GST-Fusion in *E.coli*. Die Expression des Gens steht unter Kontrolle des *tac*-Promotors, der durch Lactose oder IPTG reguliert werden kann.

#### Konstruktion

MF404 (5' NdeI) for	GATCcatatgAACGAGGTCAAGAAACG- TAAGG
MF405 (3' NotI) rev	gatcGCGGCCGCttaCCAAAAGATTTTAAC- CGTGTTG

Die BAR-Domäne wurde von Hot1 mittels PCR amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen NdeI und NotI in den NdeI/NotI geöffneten Vektor pGEX4T-1 ligiert.

### pGEX4T-1-Hob1

Dieses Plasmid dient zur Expression von Hob1 als GST-Fusion in *E.coli*. Die Expression des Gens steht unter Kontrolle des *tac*-Promotors, der durch Lactose oder IPTG reguliert werden kann.

#### Konstruktion

Hob1 (5' EcoRI) for

GATCgaattcATGAAGGGCATTGCCAAGG

Hob1 (3' NotI) rev

GATCgcggccgcCTACTCGTCCCTGACG-  
TAGTTTCC

Hob1 wurde mittels PCR amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen EcoRI und NotI in den EcoRI/NotI geöffneten Vektor pGEX4T-1 ligiert.

### pGEX4T-1-Hob3

Dieses Plasmid dient zur Expression von Hob3 als GST-Fusion in *E.coli*. Die Expression des Gens steht unter Kontrolle des *tac*-Promotors, der durch Lactose oder IPTG reguliert werden kann.

#### Konstruktion

Hob3 (5' NdeI) for

GATCcatatgTCGTGGGGTGGGTT-  
CAAAAAGTCC

Hob3 (3' NotI) rev

GATCgcggccgcTTACTGACCTATACCGCA-  
GATGG

Hob1 wurde mittels PCR amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen NdeI und NotI in den NdeI/NotI geöffneten Vektor pGEX4T-1 ligiert.

## 4.2.5 Allgemeine Materialien

### Material

Blottingpapier

Cryo-Röhrchen

Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml)

Falcon-Röhrchen (15 ml, 50 ml)

Glasperlen

Kunststoff-Küvetten

MobiSpin Columns

schwarze Mikrotiterplatten

Nylon-Membran

Petrischalen

Pipettenspitzen

PVDF-Membran

Röntgenfilm

Schikanekolben

Sterile Spritzen und Kanülen

Sterilfilter

### Bezugsquelle

Schleicher & Schüll

Roth (Karlsruhe)

Biozym

Greiner (Frickenhausen)

Sigma (Deisenhofen)

Sarstedt (Nümbrecht)

MoBiTec (Göttingen)

Greiner Bio-One (Frickenhausen)

Amersham Pharmacia

Greiner, Sarstedt

Greiner, Sarstedt

Roth (Karlsruhe)

CEA AB (Strängnäs, Schweden)

Ochs (Bovenden)

Braun (Melsungen)

Sarstedt

#### 4.2.6 Kits

Name des Kits	Bezugsquelle
E.Z.N.A. Plasmid Mini Kit	Peqlab (Erlangen)
Gel/PCR DNA Fragment Extraction Kit	Avegene (Hamburg)
Megaprime Labeling Kit	Amersham (Braunschweig)

#### 4.2.7 Chemikalien

Chemikalien	Bezugsquelle
Acrylamidmix (40:2)	Roth (Karlsruhe)
Adenin	Sigma (Deisenhofen)
Agar-Agar	Roth (Karlsruhe)
Agarose	Biozym (Hessisch Oldendorf)
Alanin	Serva (Heidelberg)
$\epsilon$ -Aminocapronsäure	Sigma (Deisenhofen)
Ampicillin	Roth (Karlsruhe)
Ammoniumchlorid	Roth (Karlsruhe)
APS	Roth (Karlsruhe)
Arabinose	Merck (Darmstadt)
Arginin	Sigma (Deisenhofen)
Asparagin	Sigma (Deisenhofen)
Asparaginsäure	Serva (Heidelberg)
Bacto-Agar	Difco (Detroit, US)
Borsäure	Sigma (Deisenhofen)
Bromphenolblau	Sigma (Deisenhofen)
Calciumchlorid	Merck (Darmstadt)
Calcofluor	Sigma (Deisenhofen)
Carboxin	Riedle-de Haen (Seelze)
Chloroform	Roth (Karlsruhe)
CMAC	Molecular Probes (Oregon, US)
$\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP	Hartmann Analytic
Cycloheximid	Roth (Karlsruhe)
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNT- Ps)	Fermentas
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma (Deisenhofen)
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck
Dithiothreitol (DTT)	Roth (Karlsruhe)
EDTA	Merck (Darmstadt)
Eisen(III)-Chlorid	Roth (Karlsruhe)
Essigsäure	Roth (Karlsruhe)
Ethanol (vergällt)	Schmidt-GmbH (Dillenburg)
Ethanol (unvergällt)	Roth (Karlsruhe)

**Chemikalien**

Ethidiumbromid  
 FM4-64  
 Glukose  
 Gluthation-Sepharose™4B  
 Gluthation-Agarose  
 Glycerin  
 Glycin  
 Hefeextrakt  
 Heringssperma-DNA  
 Histidin  
 Hygromycin  
 Isoleucin  
 Isopropanol  
 Kaliumacetat  
 Kaliumchlorid  
 Kaliumdihydrogenphosphat  
 Kaliumnitrat  
 Kobaldchlorid  
 Kupferchlorid  
 Kupfersulfat  
 L-Gluthation reduziert  
 L-Histidin  
 Lithiumacetat  
 L-Leucin  
 Lysin  
 Manganchlorid  
 Magnesiumchlorid  
 Magnesiumsulfat  
 mant-GDP  
 Methanol  
 Methionin  
 Molybdänsäure  
 clonNAT  
 Natriumacetat  
 Natriumchlorid  
 Natriumcitrat  
 Natriumdodecylsulfat (SDS)  
 Natriumdihydrogenphosphat  
 Natriumhydroxid  
 Natriumsulfat  
 Nickelchlorid

**Bezugsquelle**

Roth (Karlsruhe)  
 Molecular Probes  
 Roth (Karlsruhe)  
 Amersham GE Healthcare  
 Macherey und Nagel (Düren)  
 Roth (Karlsruhe)  
 Roth (Karlsruhe)  
 GibcoBRL Life Technologies (Eggenstein)  
 Sigma (Deisenhofen)  
 Merck (Darmstadt)  
 Duchefa Biochemie (Haarlem, NL)  
 Merck (Darmstadt)  
 Roth (Karlsruhe)  
 Merck (Darmstadt)  
 Merck (Darmstadt)  
 Roth (Karlsruhe)  
 Roth (Karlsruhe)  
 Merck (Darmstadt)  
 Sigma (Deisenhofen)  
 Roth (Karlsruhe)  
 Roth (Karlsruhe)  
 Roth (Karlsruhe)  
 Sigma (Deisenhofen)  
 Merck (Darmstadt)  
 Merck (Darmstadt)  
 Mallinckrodt Baker BV (Deventer, NL)  
 Merck (Darmstadt)  
 Merck (Darmstadt)  
 Jenabioscience  
 Roth (Karlsruhe)  
 Merck (Darmstadt)  
 Sigma (Deisenhofen)  
 Werner BioAgents (Jena)  
 Merck (Darmstadt)  
 Roth (Karlsruhe)  
 Roth (Karlsruhe)  
 Roth (Karlsruhe)  
 Roth (Karlsruhe)  
 Roth (Karlsruhe)  
 Roth (Karlsruhe)  
 Merck (Darmstadt)

### Chemikalien

Nutrient Broth  
 Orange G  
 Paraffinöl  
 Pepton  
 Phenol  
 Phenylalanin  
 Polyethylenglycol (PEG 3350)  
 Potato Dextrose Broth  
 Prolin  
 Protease Inhibitor Cocktail  
 Rubidiumchlorid  
 Salzsäure  
 Serin  
 Sorbitol  
 TEMED  
 Threonin  
 Tris  
 Triton X-100  
 Thrombin  
 Trypton  
 Tryptophan  
 Tween 20  
 Tyrosin  
 Valin  
 Yeast Nitrogen Base  
 Zinkchlorid  
 Zinksulfat

### Bezugsquelle

Difco  
 Sigma (Deisenhofen)  
 Merck (Darmstadt)  
 Difco  
 Roth (Karlsruhe)  
 Merck (Darmstadt)  
 Merck (Darmstadt)  
 Difco  
 Serva (Heidelberg)  
 Sigma (Deisenhofen)  
 Sigma (Deisenhofen)  
 Roth (Karlsruhe)  
 Roth (Karlsruhe)  
 Sigma (Deisenhofen)  
 Roth (Karlsruhe)  
 Sigma (Deisenhofen)  
 Roth (Karlsruhe)  
 Sigma (Deisenhofen)  
 GE Healthcare (München)  
 GibcoBRL Life Technologies  
 Merck (Darmstadt)  
 Roth (Karlsruhe)  
 Sigma (Deisenhofen)  
 Merck (Darmstadt)  
 Difco  
 Merck (Darmstadt)  
 Merck (Darmstadt)

## 4.2.8 Enzyme

### Name des Enzyms

Lysozym  
 Novozym234  
 Pfu-DNA-Polymerase  
 Pfx-DNA-Polymerase  
 Restriktionsendonukleasen  
  
 RNaseA  
 Shrimp Alkalische Phosphatase  
 T4-DNA-Ligase  
 Taq-Polymerase

### Bezugsquelle

Boehringer Mannheim (Mannheim)  
 GERBU (Gaiberg)  
 Laborpräparation  
 Invitrogen  
 Fermentas, Amersham (Braunschweig),  
 New England Biolabs (Schwalbach)  
 Serva (Heidelberg)  
 Fermentas  
 Roche  
 Laborpräparation

## 4.3 Puffer und Lösungen

### 4.3.1 Antibiotika

#### Antibiotika

Amp-Stammlösung:	100 mg/ml
Gentamycin-Stammlösung:	20 mg/ml
Cbx-Stammlösung:	2 mg/ml in Methanol
Hyg-Stammlösung:	426 mg/ml
Nat-Stammlösung:	200 mg/ml

### 4.3.2 Lösungen für die Plasmidisolierung mittels "Alkalischer Lyse"

#### Lösung A

50 mM Glukose  
25 mM Tris/HCl-Puffer pH 8,0  
10 mM Na<sub>2</sub>-EDTA  
100 µg/ml RNase A

#### Lösung B

200 mM NaOH  
1 % (w/v) SDS

#### Lösung C

3 M Kaliumacetat pH 4,8

### 4.3.3 Lösungen für die Agarose-Gelelektrophorese

#### TAE-Laufpuffer

40 mM Tris/HCl pH 8,3  
20 mM Natriumacetat  
2 mM EDTA

#### 4.3.4 Southern Blot-Puffer

##### Depurinierungs-Lösung

0,25 M HCl

##### Transfer-Lösung

0,4 M NaOH

##### Hybridisierungspuffer

7 % (w/v) SDS  
500 mM Natriumphosphat Puffer  
pH7,0

##### Waschpuffer

1 % (w/v) SDS  
100 mM Natriumphosphat Puffer  
pH7,0

#### 4.3.5 Puffer für SDS-Gelelektrophorese und Western Blot

##### 3x Protein-Auftragspuffer

400 mM Tris/HCl pH6,8  
30 mM DTT  
6 % (w/v) SDS  
40 % (v/v) Glycerin  
0,006 % (w/v) Bromphenolblau

##### SDS-Gelelektrophorese-Laufpuffer nach Laemmli

25 mM Tris/HCl pH8,8  
200 mM Glycin  
0,1 % (w/v) SDS

##### Proteingel-Färbelösung

0,25 % (w/v) Coomassie Brilliant  
Blue R-250  
20 % (v/v) Methanol  
10 % (v/v) Essigsäure

##### Entfärbelösung für Proteingele

20 % (v/v) Methanol  
10 % (v/v) Essigsäure



**APS-Stammlösung**

10 % (w/v) Ammoniumperoxidsulfat

**SDS-Stammlösung**

10 % (w/v) Natriumdodecylsulfat

**TBS**

50 mM Tris/HCl pH7,5  
150 mM NaCl

**Western Blot-Transferpuffer**

25 mM Tris  
192mM Glycin  
0,02 % SDS  
20 % Methanol

**TBS-T**

0,1 % (v/v) Tween 20 in TBS

**TBS-T / Milchpulver**

TBST mit 4 % (w/v) Trockenmilch

**4.3.6 Lösungen für die Herstellung von chemisch kompetenten Zellen**

**CCMB80-Puffer**

10 mM KOAc pH 7,0 (10 ml einer  
1M Stammlösung /l)  
80 mM  $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  (11,8 g/L)  
20 mM  $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$  (4,0 g/L)  
10 mM  $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$  (2,0 g/L)  
10 % Glycerin (100 ml/L)  
Auf pH 6,4 mit 0,1 M HCl einstellen

#### 4.3.7 Präparation chromosomaler DNA von *U. maydis*

##### Präparation chromosomaler DNA

Lysis-Puffer:	10 mM Tris/HCl pH8,0 100 mM NaCl 1 mM EDTA 1 % (w/v) SDS 2 % (w/v) Triton X-100
Phenol/Chloroform:	50 % (v/v) Phenol 50 % (v/v) Chloroform

#### 4.3.8 Lösungen für die Protoplasierung und Transformation von *U. maydis*

##### SCS-Puffer

20 mM Natriumcitrat-Puffer pH5,8  
1 M Sorbitol

##### SCS-Novozym-Lösung

0,5 % Novozym234 in SCS

##### STC-Puffer

10 mM Tris/HCl pH7,5  
100 mM CaCl<sub>2</sub>  
1 M Sorbitol

##### STC/PEG

40 % (w/v) Polyethylenglycol in  
STC

#### 4.3.9 Puffer für die Aufreinigung von Proteinen

Alle Puffer wurden mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> angesetzt und vor der Verwendung entgast.

##### GTPase/GEF-Lysepuffer

50 mM Tris pH 7,5  
100 mM NaCl  
10 mM MgCl<sub>2</sub>  
5 mM DTT  
Complete Proteaseinhibitor ohne  
EDTA (Roche)

**GTPase/GEF-Elutionspuffer**

50 mM Tris pH 8.0  
150 mM NaCl  
10 mM MgCl<sub>2</sub>  
15 mM reduziertes Glutathion  
5 mM DTT

**GTPase/GEF-Dialysepuffer**

20 mM Tris pH 8.0  
50 mM NaCl  
10 mM MgCl<sub>2</sub>  
10 mM Glycerin  
5 mM DTT

**4.3.10 Puffer Gelfiltration der DH-Domäne von Hot1**

**Gelfiltrationspuffer**

50 mM Tris pH 7.5  
100 mM NaCl

**4.3.11 Puffer für *in vitro* GEF-Assays**

**GEF-Assaypuffer**

20 mM Tris pH 8.0  
50 mM NaCl  
10 mM MgCl<sub>2</sub>  
10 mM Glycerin  
1 mM DTT  
50 µg/ml BSA  
400 nM mantGTP

**4.4 Mikrobiologische Nährmedien**

**4.4.1 Nährmedien für die Kultivierung von *U. maydis***

**PD-Agar**

24 g Potato Dextrose Broth  
15 g Agar  
in 1 l Aqua<sub>[dest.]</sub> lösen und bei 121°C für 20 min autoklavieren.

### **PD-Charcoal-Agar**

24 g Potato Dextrose Broth  
10 g Charcoal  
15 g Agar  
in 1 l Aqua<sub>[dest.]</sub> lösen und bei 121°C für 20 min autoklavieren.

### **Regenerations-Agar**

10 g Hefeextrakt  
20 g Pepton  
2,0 % (w/v) Saccharose  
182,2 g Sorbitol  
15 g Agar  
in 1 l Aqua<sub>[dest.]</sub> lösen und bei 121°C für 20 min autoklavieren.

### **YEP-Agar**

10 g Hefeextrakt  
20 g Pepton  
2,0 % (w/v) Glukose oder Arabinose  
2,0 % (w/v) Agar  
in 1 l Aqua<sub>[dest.]</sub> lösen und bei 121°C für 20 min autoklavieren.

### **YEPS-Flüssigmedium**

10 g Hefeextrakt  
20 g Pepton  
2,0 % (w/v) Saccharose  
in 1 l Aqua<sub>[dest.]</sub> lösen und bei 121°C für 20 min autoklavieren.

### **YNB-Flüssigmedium**

1,7 g Yeast Nitrogen Base  
0,2 % (w/v) Ammoniumsulfat oder Kaliumnitrat  
2,0 % (w/v) Glukose oder Arabinose  
in 1 l Aqua<sub>[dest.]</sub> lösen und bei 121°C für 20 min autoklavieren.

### **NSY-Glycerin-Medium**

0,8 % (w/v) Nutrient Broth  
0,1 % (w/v) Hefeextrakt  
0,5 % (w/v) Saccharose  
80 % (w/v) Glycerin  
in 1 l Aqua<sub>[dest.]</sub> lösen und bei 121°C für 20 min autoklavieren.

#### 4.4.2 Nährmedien für die Kultivierung von *S.cerevisiae*

##### YPD-Flüssigmedium

10 g Hefe-Extrakt

20 g Bacto-Pepton

in 960 ml H<sub>2</sub>O lösen und autoklavieren. Nach dem Abkühlen 40 ml 50%ige Glukoselösung (sterilfiltriert) zugeben.

##### YPD-Festmedium

10 g Hefe-Extrakt

20 g Bacto-Pepton

20 g Bacto-Agar

in 960 ml H<sub>2</sub>O lösen und autoklavieren. Nach dem Abkühlen 40 ml 50 %ige Glukoselösung (sterilfiltriert) zugeben und in sterile Petrischalen gießen.

##### Synthetic-Complete-Medium

###### Dropout-Mix -His -Leu -Ade -Trp -Ura -Met

2.0 g Alanin

2.0 g Arginin

2.0 g Asparagin-Säure

2.0 g Asparagin

2.0 g Cystein

2.0 g Glutaminsäure

2.0 g Glutamin

2.0 g Glycin

2.0 g Inositol

2.0 g Isoleucin

2.0 g Lysin

0.2 g para-Aminobenzoesäure

2.0 g Phenylalanin

2.0 g Prolin

2.0 g Serin

2.0 g Threonin

2.0 g Tyrosin

2.0 g Valin

**Für 1 Liter Medium:**

1,7 g Yeast Nitrogen Base ohne  $\text{NH}_3\text{SO}_4$

1,47 g Dropout-Mix

20 g Glukose

Je nach Selektionsmarker wurde zusätzlich zugegeben:

0,2 g L-Histidin

0,2 g Adenin

1 g L-Histidin

0,15 g Methionin

0,2 g Uracil

Der pH wurde mit NaOH auf 5,6 eingestellt. Anschließend wurde das Medium für 20 min bei  $121^\circ\text{C}$  autoklaviert. Methionin und Glukose wurden erst nach dem Autoklavieren als sterilfiltrierte Lösungen zugegeben.

**NSY-Glycerin-Medium(Einfriermedium für *U. maydis* und *S. cerevisiae*)**

8 g Nutrient Broth

5 g Saccharose

1 g Hefe-Extrakt

69,6 % (v/v) Glycerin

Mit  $\text{H}_2\text{O}$  auf 1 l auffüllen und bei  $121^\circ\text{C}$  für 20 min autoklavieren.

**4.4.3 Nährmedien für die Kultivierung des Bakteriums *E.coli***

**dYT-Flüssigmedium**

16 g Trypton

10 g Hefeextrakt

5 g NaCl

in 1 l  $\text{H}_2\text{O}$  lösen und bei  $121^\circ\text{C}$  für 20 min autoklavieren.

**LB (Luria-Bertani)-Flüssigmedium**

10 g Trypton

5 g Hefe-Extrakt

10 g NaCl

in 1 l  $\text{H}_2\text{O}$  lösen und bei  $121^\circ\text{C}$  für 20 min autoklavieren.

**dYT-Festmedium**

16 g Trypton

10 g Hefeextrakt

5 g NaCl

15 g Agar

in 1 l  $\text{H}_2\text{O}$  lösen und bei  $121^\circ\text{C}$  für 20 min autoklavieren. Anschließend in sterile Petrischalen gießen.

### **LB-Festmedium**

10 g Trypton  
5 g Hefe-Extrakt  
10 g NaCl  
15 g Agar

in 1 l H<sub>2</sub>O lösen und bei 121°C für 20 min autoklavieren. Anschließend in sterile Petrischalen gießen.

### **dYT-Flüssigmedium mit Glycerin (Einfriermedium)**

16 g Trypton  
10 g Hefeextrakt  
5 g NaCl

Mit 69,6 % (v/v) Glycerin versetzen, auf 1 l H<sub>2</sub>O auffüllen und bei 121°C für 20 min autoklavieren.

## **4.5 Kultivierung von Mikroorganismen**

### **4.5.1 Kultivierung von *Escherichia coli***

#### **Kultivierung von *E.coli* in Flüssigmedium**

Das Bakterium *E.coli* wurde, soweit nicht anders erwähnt, unter aeroben Bedingungen in autoklaviertem dYT-Medium bei 37°C angezogen. Das Medium wurde bei Bedarf mit 100µg/ml Ampicillin bzw. 20 µ/ml Gentamycin versetzt. Die Kultivierung von *E. coli* für die Überexpression der verschiedenen Proteine erfolgte bei 16°C für 2 Tage.

#### **Kultivierung von *E.coli* auf Festmedium**

Für die Anzucht von *E. coli* auf Festmedium wurde dYT-Agar verwendet, der bei Bedarf mit 100µg/ml Ampicillin bzw. 20 µ/ml Gentamycin versetzt wurde.

### **4.5.2 Langzeitlagerung von *E. coli***

Für die Langzeitlagerung von *E. coli* wurden dicht gewachsene Übernachtskulturen 1:1 mit dYT-Flüssigmedium mit Glycerin gemischt und bei -80°C weggefroren.

### **4.5.3 Kultivierung von *U. maydis***

#### **Kultivierung von *U. maydis* in Flüssigmedium**

Flüssigkulturen von *Ustilago maydis* wurden in der Regel in YEPS Medium angezogen. In den Fällen, in denen die Anwesenheit bzw. die Abwesenheit einer Kohlenstoff- oder Stickstoffquelle im Medium erforderlich war, wurde YNB-Medium verwendet, dem der gewünschte Stoff zugesetzt wurde. Die Kulturen wurden unter aeroben Bedingungen bei 28°C inkubiert.

### **Kultivierung von *U. maydis* auf Festmedium**

Für die Anzucht auf Festmedium wurde meist PD-Agar verwendet, dem bei Bedarf Fungizide, wie z.B. Carboxin, zugesetzt wurden. In besonderen Fällen wurde, aus oben beschriebenen Gründen, wurde YNB-Agar verwendet.

#### **4.5.4 Langzeitlagerung von *U. maydis***

Zur Herstellung von Dauerkulturen wurden Übernachtskulturen des Pilzes 1:1 mit NSY-Glycerin-Medium gemischt und bei -80°C eingefroren.

#### **4.5.5 Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae***

##### **Kultivierung von *S. cerevisiae* in Flüssigmedium**

Die Anzucht von *S. cerevisiae* in Flüssigmedium erfolgte, solange nicht auf Auxotrophiemarker selektiert werden sollte, in YPD. Bei der Selektion auf Auxotrophiemarker erfolgte die Anzucht in "Synthetic Complete"-Medium, dem die den Selektionsmarkern entsprechenden Amino- bzw. Nukleinsäuren fehlten.

##### **Kultivierung von *S. cerevisiae* auf Festmedium**

Die Anzucht von *S. cerevisiae* auf Festmedium erfolgte, solange nicht auf Auxotrophiemarker selektiert werden sollte, auf YPD-Festmedium. Bei der Selektion auf Auxotrophiemarker erfolgte die Anzucht auf "Synthetic Complete"-Festmedium, dem die den Selektionsmarkern entsprechenden Amino- bzw. Nukleinsäuren fehlten.

#### **4.5.6 Langzeitlagerung von *S. cerevisiae***

Die Langezeitlagerung von *S. cerevisiae* erfolgte in NSY-Glycerin-Medium. Hierzu wurde 1 ml einer dichten Kultur mit 1ml NSY-Glycerin-Medium gemischt und in 2ml Cryoröhrchen bei -80°C eingefroren.

### **4.6 Molekularbiologische Techniken**

#### **4.6.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli* im analytischen Maßstab**

Für die Isolation von Plasmid-DNA wurde eine Variante der "Alkalischen Lyse" (Birnboim and Doly, 1979) verwendet. Hierbei wurden zunächst 3 ml einer in Anwesenheit eines passenden Antibiotikums angezogenen Übernachtskultur abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die sedimentierten Zellen in 100 µl Lösung A resuspendiert. Zu dieser Zellsuspension wurden 200 µl Lösung B gegeben und der Ansatz für 5 min bei RT inkubiert, bis sich ein klares Lysat bildete. Dieses Lysat wurde durch Zugabe von 150 µl Lösung C neutralisiert und anschließend in einer Tischzentrifuge für 10 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Plasmid-DNA durch die Zugabe von 500 µl Isopropanol



und einen weitere Zentrifugationsschritt (14000 rpm, 15min, 4°C) gefällt. Der Überstand wurde verworfen und der Niederschlag mit 1000  $\mu$ l 70 %igem Ethanol gewaschen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt für 10 min bei 14000 rpm wurde der Ethanol vollständig entfernt und die präzipitierte DNA kurz an der Luft getrocknet. Anschließend wurde sie in 50-70  $\mu$ l 0.1 x TE mit RNase aufgenommen, 10 min bei RT inkubiert und bei -20°C gelagert.

Wenn besonders reine Plasmid-DNA, z.B. für Sequenzierungen, benötigt wurde, erfolgte die Isolation mit Hilfe des High Speed Plasmid Mini Kits (Avegene, Hamburg) nach Herstellerangaben.

### 4.6.2 Restriktionsenzymatische Spaltung von DNA

Zur restriktionsenzymatischen Spaltung von DNA wurden Enzyme und korrespondierende Puffersysteme der Firmen New England Biolabs und Fermentas verwendet. Die jeweiligen Pufferbedingungen wurden nach den Herstellerangaben gewählt. Bei Doppelverdauen wurde auf die Puffer-Kompatibilitätstabellen der jeweiligen Hersteller zurückgegriffen.

### 4.6.3 Dephosphorylierung von geschnittener Plasmid-DNA

Um die Selbstligation von Vektoren zu minimieren, wurden geschnittene Vektoren vor der Ligation mit Hilfe der aus Garnelen isolierten Alkalischen Phosphatase (*shrimp alkaline phosphatase* (SAP)) dephosphoryliert. Hierzu wurde nach Ende der restriktionsenzymatischen Spaltung 1  $\mu$ l SAP zum Restriktionsansatz gegeben und der Ansatz für weitere 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Alkalische Phosphatase durch eine Hitzebehandlung inaktiviert (15 min bei 70°C).

### 4.6.4 Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Fragmente wurden mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese (Sharp et al., 1973) ihrer Größe nach aufgetrennt. Zur Herstellung der Gele wurde eine Suspension von 0,8 - 2 % Agarose in Elektrophoresepuffer (Tris-Acetat-EDTA (TAE)) bis zum vollständigen Lösen der Agarose aufgekocht und anschließend bis auf  $\approx$  60°C abgekühlt. Diese Lösung wurde bis zu einer Endkonzentration von 1-5  $\mu$ g/ml mit Ethidiumbromid versetzt und in einen Gelschlitten mit einem eingesteckten Gelkamm gegossen. Nach dem Erstarren des Gels wurde der Kamm entfernt und das Gel in eine mit Elektrophoresepuffer gefüllte Elektrophoresekammer gelegt.

DNA-Lösungen wurden mit 1/10 ihres Volumens an Probenpuffer versetzt und in die Taschen des Gels gegeben. Als Größenstandard diente der kommerziell erhältlichen Größenstandard Generuler<sup>TM</sup> DNA Ladder Mix (Fermentas).

Die Auftrennung erfolgte bei einer konstanten Spannung von 120 V. Nach erfolgter Auftrennung wurde das in die DNA interkalierte Ethidiumbromid durch Anregung mit UV-Licht sichtbar gemacht.

### 4.6.5 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Um spezifische DNA-Fragmente zu isolieren, wurde diese zunächst mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Die zu isolierenden DNA-Fragmente wurden unter langwelligem

UV-Licht ( $\lambda=360$  nm) ausgeschnitten und mit Hilfe des Gel/PCR DNA Fragments Extraktion Kit der Firma Avegene (Hamburg) nach Herstellerangaben eluiert.

### 4.6.6 Ligation von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente wurden mittels des Enzyms T4-DNA-Ligase ligiert. Ligationen erfolgten in einem Endvolumen von 20  $\mu$ l. Der Vektor und das zu ligierende Fragment wurden im Verhältnis 1:5 eingesetzt. Es wurden zusätzlich 2  $\mu$ l Ligationspuffer und 1  $\mu$ l T4-DNA-Ligase sowie steriles Wasser bis zu einem Endvolumen von 20  $\mu$ l eingesetzt. Die Ligation erfolgte über Nacht bei 16°C. Anschließend erfolgte eine Transformation von chemisch kompetenten Bakterien mit ungefähr 10  $\mu$ l der ligierten DNA.

### 4.6.7 Herstellung chemisch kompetenter *E.coli*-Zellen

Um chemisch kompetente *E.coli*-Zellen des Stamms Top10 herzustellen, wurde die Kalzium-Mangan-Methode nach (Hanahan et al., 1991) verwendet. Hierzu wurden die Zellen zunächst in SOB-Medium ohne Magnesium bis zu einer OD<sub>550</sub> von 0,3 angezogen. Wenn die Kultur diese Zelldichte erreicht hatte, wurden die Zellen für 10 min in Eiswasser gekühlt und durch einen Zentrifugationschritt (15 min, 3200rpm) geerntet. Die sedimentierten Zellen wurden in 1/3 Volumen eiskalten CCMB80-Puffer resuspendiert und für 20 min in einem Eis-Wasserbad inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationschritt (15 min, 3200rpm) wurden die sedimentierten Zellen in 1/12 Volumen CCMB80-Puffer resuspendiert, aliquotiert und bei -80°C gelagert.

### 4.6.8 Transformation von chemisch kompetenten *E.coli*-Zellen mit Plasmid-DNA

Zur Transformation von chemisch kompetenten Zellen mit Plasmid-DNA wurde 1  $\mu$ l der Plasmid-DNA (bei Ligationen 5-10  $\mu$ l) mit 100  $\mu$ l chemisch kompetenter Zellen gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Dann wurde der Ansatz für 1 min auf 42°C erwärmt und anschließend sofort mit 800  $\mu$ l dYT-Medium versetzt. Es folgte eine Inkubation für 30 min bei 37°C bei 150 rpm auf dem Schüttler. Anschließend wurden zwischen 100 und 200  $\mu$ l des Ansatzes auf Selektionsplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

### 4.6.9 Polymerase-Kettenreaktionen (PCR)

Die PCR-Reaktion (Bell, 1989; Mullis et al., 1986; White et al., 1989) dient der Amplifikation von spezifischen, doppelsträngigen DNA-Fragmenten. Durch eine thermostabile Polymerase werden mit Hilfe von Primern und dNTPs spezifische DNA-Fragmente amplifiziert.

Die PCR-Reaktion läuft in 4 charakteristischen Schritten ab. Zunächst wird die doppelsträngige DNA durch Erhitzen auf 94°C denaturiert und so in einzelsträngige DNA überführt. Bei einer Temperatur zwischen 50-60°C binden die PCR-Primer an die DNA-Einzelstränge (Annealing). Die thermostabile Polymerase synthetisiert anschließend ausgehend von den Primern einen komplementären DNA-Strang, hierbei wird die Temperatur dem Optimum der jeweiligen Polymerase angepasst. Durch eine erneute Denaturierung bei 94°C beginnt der Zyklus erneut.

Standard-PCR-Reaktionen wurden in einem Endvolumen von 50  $\mu$ l wie folgt durchgeführt:

5 $\mu$ l	10x PCR-Puffer
1 $\mu$ l	dNTPs (10 mM)
1 $\mu$ l	5'Primer (25 mM)
1 $\mu$ l	3'Primer (25 mM)
1 $\mu$ l	Matrizen-DNA ( $\approx$ 100ng)
1 $\mu$ l	Phusion DNA-Polymerase (=2,5 U)
H <sub>2</sub> O	ad 50 $\mu$ l

### 4.6.10 Präparation von chromosomaler DNA aus *Ustilago maydis*

Zur Gewinnung von chromosomaler DNA aus *U. maydis* wurden 2 ml einer dicht gewachsenen Übernachtskultur abgenommen und in einem entsprechenden Reaktionsgefäß zentrifugiert (1 min, 13000 rpm). Das Sediment wurde in 500  $\mu$ l Lysis-Puffer resuspendiert und mit 0,3 g Glasperlen und 500  $\mu$ l Phenol/Chloroform versetzt. Der Ansatz wurde nach 10 minütigem Schütteln auf dem Vibrax zentrifugiert (10 min, 13000 rpm). Die obere, klare Phase wurde in einem neuen Reaktionsgefäß mit 50  $\mu$ l 3 M Natriumacetat, pH5,3 und 500  $\mu$ l 96 %igem Isopropanol gemischt und zentrifugiert (10 min, 13000 rpm). Der Niederschlag wurde mit 1000  $\mu$ l 70 %igem Ethanol gewaschen und anschließend nach vollständiger Entfernung des Ethanols in 50  $\mu$ l TE mit RNaseA aufgenommen. Die Langzeitlagerung der präparierten DNA erfolgte bei -20°C.

### 4.6.11 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA-Fragmenten erfolgte nach der Kettenabbruchmethode (Sanger et al., 1977). Die Reaktionszusammensetzungen wurden den Herstellerangaben folgend gewählt (eurofins MWG Operon, Ebersberg). Die zu sequenzierende DNA diente als Matrize für eine Polymerasen-Kettenreaktion (PCR) mit nur einem Primer und sowohl dNTPs als auch markierten ddNTPs, die bei Einbau aufgrund der fehlenden 3'OH Gruppe zum Reaktionsabbruch führen. Die mit den vier verschiedenen ddNTPs markierten Fragmente konnten in einer Gelspur gemeinsam aufgetrennt und eingelesen werden.

### 4.6.12 Transfer und Detektion von DNA auf Membranen (Southern Blot)

Zur Detektion von DNA-Restriktionsfragmenten definierter Größe und Sequenz wurde die Southern Blotting Methode (Southern, 1992) durchgeführt. Dabei wurden elektrophoretisch aufgetrennte DNA-Fragmente auf eine Nylonmembran übertragen und durch Hybridisierung mit radioaktiv markierten Sonden nachgewiesen. Chromosomale DNA wurde mit geeigneten Restriktionsenzymen verdaut, im Agarosegel aufgetrennt und zur Dokumentation unter UV-Licht photographiert. Das Gel wurde erst für 15 min zur Depurinierung in 0,25 M HCl und danach für 20 min in 0,4 N NaOH inkubiert. Zur Übertragung der DNA auf die Nylonmembran (Hybond-N<sup>+</sup>, Amersham Pharmacia) wurde eine Glasplatte über ein Bassin mit 0,4 N NaOH gelegt. Quer über die Glasplatte wurde ein Streifen in Transferpuffer getränktes Blotting-Papier so aufgelegt, dass beide Enden ins Vorratsbassin eintauchten. Dann wurde das Gel mit den Taschenöffnungen nach unten aufgelegt, gefolgt von der, mit Transferpuffer benetzten, Nylon-

membran und drei Schichten in Puffer getränkten Blotting-Papiers. Um die aufwärtsgerichteten Kapillarkräfte zu unterstützen, wurde eine dicke Schicht saugfähiges Papier aufgelegt und die Konstruktion mit einem Gewicht von 300-500 g beschwert. Das Gel wurde über Nacht geblottet. Die Membran wurde nach dem Blotten getrocknet und die DNA durch UV-Bestrahlung (254 nm, 1200 mJ/cm<sup>2</sup>) im Stratalinker 2400 (Stratagene) darauf fixiert. Die auf der Nylonmembran fixierte DNA wurde mit einer radioaktiven Sonde hybridisiert (Church and Gilbert, 1984). Die Membran wurde 20 min bei 60°C in 15 ml Southern-Hybridisierungspuffer vorinkubiert. Die Sonde wurde 5 min bei 95°C denaturiert und hinzugegeben (Endkonzentration etwa 10<sup>6</sup> cpm/ml). Es wurde über Nacht bei 60°C inkubiert und die Membran anschließend in 2x 15 ml Southern-Waschpuffer 20 min gewaschen. Anschließend wurde die Membran in Plastikfolie eingeschweißt und ein bis zwei Tage in einer Phosphorimager Kassette (Amersham) exponiert. Die Detektion der Signale erfolgte mit Hilfe eines Phosphorimagers (Storm860, Amersham).

### 4.6.13 Herstellung von radioaktiv markierten Sonden

Zur Herstellung der radioaktiven Sonden wurde das Megaprime Labeling System Kit der Firma Amersham Biosciences verwendet. Dabei wurden 25 ng Sonden-DNA mit einer Länge von 400-1000bp mit 5 µl der Primer-Lösung (Hexanukleotide mit zufälliger Sequenz) und destilliertem Wasser auf ein Volumen von 33 µl aufgefüllt und im Heizblock bei 95°C 5 min denaturiert. Danach wurde der Ansatz kurz auf Eis gekühlt und 10 µl Reaktionspuffer (Puffersubstanzen und alle dNTPs außer dCTP), 2 µl Klenow Polymerase und 5 µl α<sup>32</sup>P-dCTP zugegeben. Der Ansatz wurde 20 Minuten bei 37°C inkubiert und die Reaktion anschließend durch Zugabe von 5 µl 0,2 M EDTA gestoppt. Die Sonde wurde zuletzt mit Hilfe einer Mobitec S-200 Säule durch Zentrifugation von überschüssigen Nukleotiden gereinigt.

### 4.6.14 Transformation von *S. cerevisiae* mit Plasmid-DNA

Die Transformation der Hefe *S. cerevisiae* mit Plasmid-DNA erfolgte nach einer Variante der Lithiumacetat-PEG-Transformation (H.Ulrich, pers. Mitteilung). Der zu transformierende Hefestamm wurde in 50 ml YPD oder Selektionsmedium über Nacht bei 30°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0.5 bis 1.5 angezogen. Die Kultur wurde in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen bei 3000 rpm für 3 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen wurden in einem angepassten Volumen LiT aufgenommen (1300 µl ≈ 12 Transformationen). 100 µl dieses Ansatzes wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben. Es wurden 5 µl (10mg/ml) denaturierte (für 5 min auf 95°C erhitzt und dann auf Eis abgekühlt) Heringssperma-DNA und 1 µg Plasmid-DNA (1 µl Midipräp oder 4 µl Minipräp) hinzugefügt. Zu diesem Ansatz wurden 500 µl LiT-PEG zugeben und gut durchmischt. Es folgte eine Inkubation für 15 min bis 1h bei Raumtemperatur. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden 50 µl DMSO zugegeben. Es folgte eine Hitzeschockbehandlung für 15 min bei 42°C. Nach Ende des Hitzeschocks wurde der Ansatz für 30 s bei 3000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen, die Zellen in 100 µl H<sub>2</sub>O resuspendiert und auf Selektionsmedium ausplattiert.

#### 4.6.15 Protoplastierung von *U. maydis*

Zur Herstellung von *U. maydis*-Protoplasten wurden 50 ml YEPS-Flüssigkulturen der jeweiligen Stämme bis zu einer optischen Dichte ( $OD_{600}$ ) von ca. 0,5 angezogen und anschließend zentrifugiert (3500 rpm, 5 min, RT). Das Zellsediment wurde in 25 ml SCS-Lösung resuspendiert und erneut abzentrifugiert (3500 rpm, 5 min, RT). Dann wurde das Sediment in 2 ml SCS-Novozym-Lösung aufgenommen und die Protoplastierung der Zellen unter dem Mikroskop verfolgt. Als der Anteil an Protoplasten im Ansatz ca. 70% betrug, wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 ml eiskalter SCS-Lösung gestoppt und die Protoplasten pelletiert (2500 rpm, 10 min, 4°C). Das Sediment wurde zweimal mit 10 ml eiskalter SCS-Lösung und einmal mit dem gleichen Volumen an eiskalter STC-Lösung gewaschen und in 300  $\mu$ l eiskalte STC-Lösung aufgenommen. Die Protoplasten wurden in Volumina von 50  $\mu$ l aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

#### 4.6.16 Transformation von *U. maydis*-Protoplasten

Zur Transformation wurden 50  $\mu$ l *U. maydis*-Protoplasten auf Eis aufgetaut und mit 500 ng der zu transformierenden DNA versetzt. Der Ansatz wurde für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 350  $\mu$ l STC/PEG zugegeben und erneut für 15 min auf Eis inkubiert. Durch die Zugabe von PEG wurden die Zellmembranen für die zugegebene DNA permeabel gemacht. Der Ansatz wurde auf Regenerationsagar ausplattiert. Dieser wurde in zwei Schichten übereinander gegossen, von denen die untere das zur Selektion benötigte Antibiotikum in zweifacher Konzentration enthielt, für das die transformierte DNA die Resistenz vermittelt (Hygromycin: 400  $\mu$ g/ml, Carboxin 4  $\mu$ g/ml, Nourseothricin: 300  $\mu$ g/ml). Die obere Schicht war frei von Selektionsfaktoren. So stellte sich durch Diffusion zwischen den beiden Schichten erst über einen längeren Zeitraum hinweg die übliche Konzentration des Antibiotikums ein, so dass es vorher zur Ausprägung der Resistenz in den transformierten Zellen und zu deren Regeneration kommen konnte. Die Platten wurden bei 28°C inkubiert.

#### 4.6.17 Genetische Modifikation von *U. maydis*

*U. maydis* besitzt ein hoch effizientes Rekombinationssystem. Dies kann man nutzen, um mittels homologer Rekombination das Genom von *U. maydis* zu modifizieren.

##### Herstellung von Deletionsmutanten in *U. maydis*

Zur Deletion von Genen wurde der offene Leserahmen des jeweiligen Gens durch eine Antibiotika-Resistenzkassette ersetzt. Hierzu wurden homologe Bereiche, die die auszutauschende Region links und rechts flankieren, mittels PCR amplifiziert. Diese Bereiche umfassen jeweils ungefähr 1000 bp. Durch Ligationen bzw. homologe Rekombination in *S. cerevisiae* wurden diese Flanken mit einem *E. coli*-Vektor und einer Antibiotika-Resistenzkassette verknüpft. Die Resistenzkassette liegt hierbei zwischen den beiden flankierenden Bereichen. Nach klonaler Vermehrung in *E. coli* wurde der Bereich mit den beiden flankierenden Regionen und der Resistenzkassette ausgeschnitten und *U. maydis* mit diesem DNA-Fragment transformiert. Durch homologe Rekombination kommt es zur Deletion des jeweiligen Gens (vergleiche Abb. 4.3, A).

### Herstellung von GFP-Fusionen am endogenen Lokus in *U. maydis*

Nach dem gleichen Prinzip wie Deletionsmutanten können auch GFP-Fusionen eines Gens unter Kontrolle des endogenen Promotors hergestellt werden. Hierzu entspricht die linke Flanke dem 3'-Bereich des offenen Leserahmens, während die rechte Flanke identisch zur rechten Flanke des Deletionskonstrukts ist. Durch homologe Rekombination der offene Leserahmen von GFP hinter den Leserahmen des jeweiligen Gens gesetzt, hierbei wird das Stop-Codon des Gens deletiert, um die Expression des GFP-Fusionsproteins zu ermöglichen (vergleiche Abb. 4.3, B).

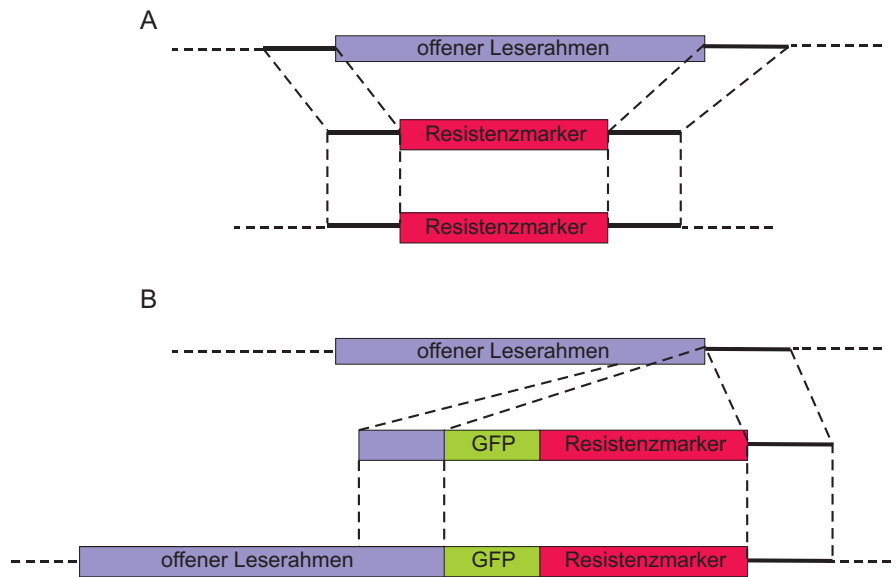


Abbildung 4.3: **Genetische Modifikationen von *U. maydis***

(A) Schematische Darstellung der Herstellung von Deletions-Mutanten in *U. maydis*. Durch homologe Rekombination wird das entsprechende Gen durch eine Antibiotika-Resistenzkassette ersetzt. (B) Herstellung von GFP-Fusionen am genomischen Lokus. Durch homologe Rekombination wird ein GFP an den für den C-Terminus des Proteins kodierenden Bereich des jeweiligen Gens fusioniert.

### Herstellung von Deletionskonstrukten für *U.maydis* mittels *in vivo*-Rekombination in *S.cerevisiae* ("Drag and Drop")

Die Herstellung von Konstrukten für die Transformation von *Ustilago maydis* erfordert mehrere Schritte, die oftmals mit einem größeren Zeit- und Arbeitsaufwand einhergehen. Aus diesem Grund wurde eine Ein-Schritt-Methode zur Herstellung dieser Konstrukte genutzt (Colot et al., 2006). Diese Methode macht sich die Eigenschaften der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* zu nutzen, homologe Rekombination mit sehr kurzen Homologie-Regionen (es reichen 29 bp) hoch effizient durchzuführen. Die wurde benutzt, um Konstrukte für die genetische Manipulation von *U. maydis* durch homologe Rekombination in *S.cerevisiae* herzustellen. Die folgenden Schritte beschreiben die Erstellung eines Konstruktes für die Deletion von Genen in *Ustilago maydis*, Konstrukte für andere Manipulationen des Genoms wie z.B. das Herstellen von GFP-Fusionen können über entsprechende Anpassung der flankierenden Bereiche und Resistenzkassetten durchgeführt werden. Dabei wurden 1000bp lange Bereiche oberhalb und unterhalb des zu deletierenden Gens

durch PCR amplifiziert. Diese Flanken wurden dabei so konstruiert, dass sie eine 29 bp Homologieregion sowohl zum Hefvektor pRS426 (2 $\mu$ -Shuttleplasmid, Ura3-Auxotrophiemarker) als auch zur Resistenzkassette besitzen. Für die Herstellung der Konstrukte wurde ein Resistenzkassetten-systems benutzt, das speziell für den Gebrauch in *U. maydis* konzipiert ist (Brachmann et al., 2004). Die Resistenzkassetten dieses Systems werden von *Sfi*I-Schnittstellen flankiert. Dieses Enzym schneidet an Stellen der Sequenz GGCCNNNNNGGCC. Dabei waren die fünf Nukleotide zwischen den GGCC-Flanken der Schnittstelle am 3'-Ende der linken Flanke und am 5'-Ende der rechten Flanke unterschiedlich. Der rückwärtsgerichtete Primer der linken Flanke und der vorwärtsgerichtete Primer der rechten Flanke des zu deletierenden Gens, sind mit den Homologieregionen der Resistenzkassette versehen, beginnend mit den entsprechenden *Sfi*I-Schnittstellen. In dem vorwärtsgerichteten Primer der linken Flanke und dem rückwärtsgerichteten Primer der rechten Flanke ist die passende Homologieregion zum Hefvektor eingefügt worden. Der Hefvektor wurde mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Kpn*I geöffnet. Die Resistenzkassette wurde mit *Sfi*I ausgeschnitten. Durch die Homologieregion zwischen Flanke und Kassette wird diese Schnittstelle idealerweise wieder hergestellt. Für die Transformation der Fragmente in *S. cerevisiae* wurde der Hefvektor mit den einzelnen Fragmente gemischt, wobei 200ng DNA des verdauten Hefvektors, jeweils 500ng DNA der beiden Flanken und 500ng DNA der eluierten Resistenzkassette benutzt wurden. Eine 50 ml Übernachtskultur des Hefestamms DF5 *his1-1* wurde bei 3500rpm abzentrifugiert und in 1ml LiT aufgenommen. Pro Transformation wurden 100 $\mu$ l in Eppendorf-Cups aliquotiert. Die Transformation wurde nach dem oben aufgeführten Protokoll durchgeführt und auf SC-Platten ohne Uracil ausplattiert. Nach 4 Tagen wurden mehrere Kolonien gepickt und in SC-Ura Flüssigmedium 24 Stunden angezogen.

### ""Plasmid-rescue"" aus *S. cerevisiae*

Je Kultur wurden 1,5 ml Zellen geerntet und das Pellet in 200  $\mu$ l der Lösung I des Plasmid Mini Kits (Peqlab) resuspendiert. Es wurden 50  $\mu$ l Glasperlen hinzugegeben und die Mischung für 15 Minuten auf dem Vibrax auf maximaler Stufe geschüttelt. Die Zellsuspension wurde von den Glasperlen getrennt und in ein neues Cup überführt. Die Plasmidisolierung wurde gemäß Herstellerprotokoll weiter durchgeführt. 5  $\mu$ l des Eluats wurden für eine Transformation in *E. coli* benutzt. Die Plasmide wurden nach Vervielfältigung in *E. coli* isoliert (vgl. Abschnitt ??) und mit Hilfe von Restriktionsverdauen analysiert.

#### 4.6.18 Integration von Vektoren in den genomischen *ip*-Locus

Der *cbx*- bzw. *ip*-Locus von *U. maydis* kodiert für die Eisen-Schwefel-Untereinheit der Sukzinat-Dehydrogenase. Ein Aminosäureaustausch an Position 257 von Histidin nach Leucin führt dazu, dass der Organismus eine Resistenz gegen das Fungizid Carboxin entwickelt. Spezielle Vektoren tragen dieses Carboxinresistenz vermittelnde Allel des *ip*-Gens. Der Vektor kann durch eine *Ssp*I Schnittstelle in dem *ip*-Allel linearisiert werden und nach Transformation in *U. maydis* durch ortsspezifische, homologe Rekombination in den genomischen *ip*-Locus integrieren. Durch die Integration des Vektors wird der *ip*-Locus verdoppelt.

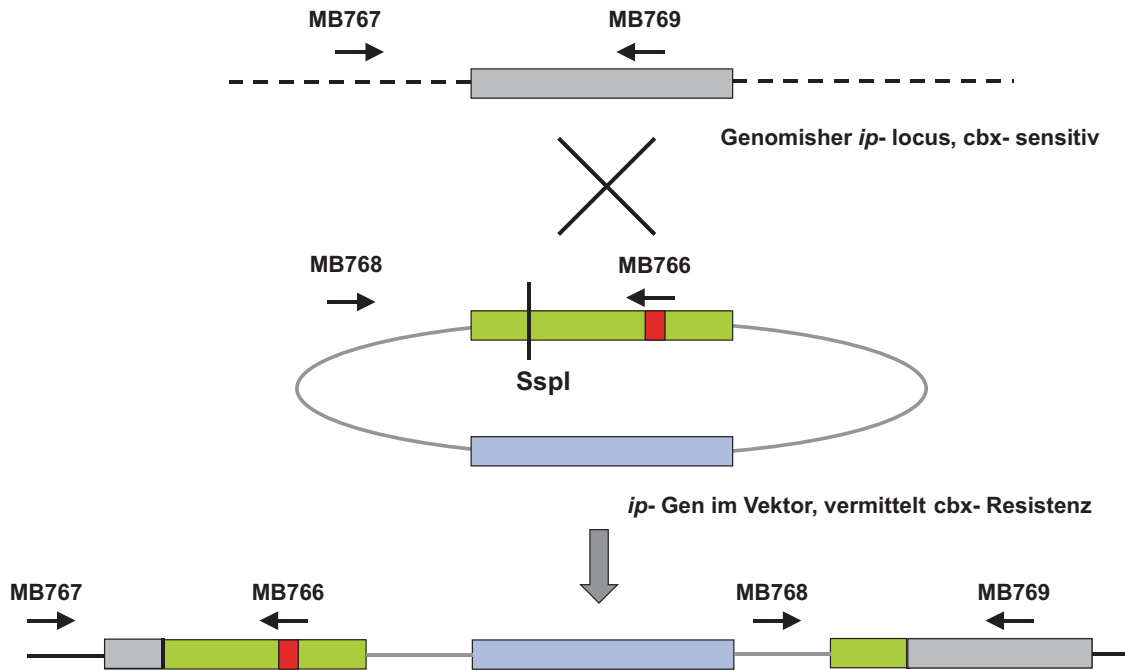


Abbildung 4.4: **Integration von Plasmiden in den genomischen *ip*-Locus**

Die verwendeten Plasmide tragen neben den erstellten Konstrukten das *ip<sub>r</sub>*-Allel. Nach Linearisierung rekombiniert dieses *ip<sub>r</sub>*-Allel mit dem genomischen *ip<sub>s</sub>*-Allel. Eine erfolgreiche Integration kann mit den angegebenen Primerkombinationen überprüft werden.

## 4.7 Produktion und Aufreinigung von rekombinanten Proteinen

### 4.7.1 Produktion von rekombinanten Rho-Proteinen

Rekombinante Rho-Proteine wurden als N-terminale GST-Fusionsprotein in *Escherichia coli* produziert (Self and Hall, 1995). Zur Expression dieser Konstrukte wurden die entsprechenden codierenden Bereiche in den GST-Expressionsvektor pGEX4T-1 ligiert. Nach klonaler Vermehrung in *E. coli* und Verifikation der resultierenden Expressionsvektoren durch Sequenzierung wurden *E. coli*-Arctic-Express-Stämme mit den Vektoren transformiert. Die idealen Bedingungen für die Proteinproduktion wurden zunächst anhand einer Induktion im kleinen Maßstab bestimmt und dann eine Großkultur unter den entsprechenden Bedingungen induziert. Für kleine GTPasen der Rho-Familie sowie die RhoGEFs aus *U. maydis* und die humanen Proteine hat es sich bewährt, die Proteinproduktion bei geringen IPTG-Mengen (0,1 - 0,2 mM) und einer gesenkten Temperatur (16°C) über 2 Tage durchzuführen. Unter diesen Bedingungen war sowohl die Löslichkeit als auch die Aktivität der gereinigten Proteine am höchsten. Es wurde zunächst eine Vorkultur angezogen, aus der dann eine Großkultur im Verhältnis 1:100 inokuliert wurde. Bei Erreichen einer OD<sub>600</sub> von ungefähr 0,6 wurde die Temperatur auf 16°C gesenkt und die Induktion der Proteinproduktion durch Zugabe von IPTG bis zu einer Endkonzentration von 0,1 - 0,2 mM induziert. Die Induktion erfolgte dann für 2 Tage. Die Kultur wurde anschließend durch Zentrifugation geerntet, der Überstand verworfen und die sedimentierten Zellen entweder direkt weiter verarbeitet oder bei -80°C gelagert.



#### 4.7.2 Aufreinigung von Rho-GTPasen aus *E.coli*

Alle Reinigungsschritte erfolgten auf Eis bzw. bei 4°C. Alle genutzten Puffer wurden vor Benutzung entgast und mit 5 mM DTT versetzt, um eine Oxidation der GTPasen zu verhindern. Die sedimentierten Zellen wurden in GTPase-Lysepuffer, der mit Protease-Inhibitoren (Complete<sup>tm</sup> ohne EDTA (Roche)) versetzt war, resuspendiert und mittels 3 Passagen durch eine "French-Press"-Zelle lysiert. Zelltrümmer wurden durch einen Zentrifugationsschritt (100000 x g, 1h) sedimentiert und der geklärte Überstand durch einen 0,45 µM-Sterilfilter weiter gereinigt. Die weitere Reinigung erfolgte mit Hilfe von Glutathion Sepharose Beads (Macherey und Nagel). Der Überstand wurde auf 300µl Beads aufgetragen und für 1 Stunde rollend inkubiert, ausgiebig mit GTPase-Lysepuffer gewaschen und anschließend mit Elutionspuffer eluiert. Proteinhaltige Fraktionen wurden vereinigt und über Nacht gegen GEF-Assay-Puffer dialysiert. Die dialysierten Proteine wurden mit Hilfe von Vivaspin Ultrafiltrationssäulen (Sartorius, Göttingen) auf eine Endkonzentration von 50 µM ankonzentriert und dann in kleinen Aliquots bei -80°C gelagert. Die Qualität der Aufreinigung wurde mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung des Gels überprüft.

#### 4.7.3 Produktion und Aufreinigung von rekombinanten Rho-GEFs aus *E.coli*

Rekombinante Rho-GEFs wurden als N-terminale GST-Fusionsproteine in *E.coli* überproduziert und mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt. Die Überproduktion und Aufreinigung erfolgte analog zu den bereits für die Rho-GTPasen beschriebenen Methoden. Es zeigte sich im Lauf der Experimente, dass GEFs oftmals eine nur sehr geringe Löslichkeit aufweisen; um diese zu erhöhen, wurde nur die katalytische DH-Domäne bzw. die DH-PH-Tandemdomäne überproduziert.

#### 4.7.4 Produktion und Aufreinigung der Hot1 DH-Domäne aus *E.coli* für die Kristallisationsversuche

##### Chromatographische Aufreinigung

Der erste chromatographische Schritt war die Aufreinigung mittels GST-Affinitätschromatographie. Als Matrix wurde GSH-Agarose benutzt und als System das Äkta-Purifier System der Firma GE Healthcare. Das geklärte Zellysat einer präparativen Expression wurde mit Hilfe eines Superloops mit einer Geschwindigkeit von 1 mL/min auf eine Säule mit circa 10 mL Bettvolumen aufgetragen. Anschließend wurde mit 10 Säulenvolumen Wasch-Puffer gespült. Die Elution erfolgte mit einem Stufengradienten mit bis zu 15 mM Glutathion, wobei die DH-Domäne von Hot1 bei einer Glutathionkonzentration von 2 bis 10 mM eluiert wurden. Die Reinheit der einzelnen Fraktionen wurde mittels SDS-PAGE überprüft, die sehr reinen Fraktionen wurden miteinander vereinigt. Der GST-Teil des Fusionsproteins wurde mit Thrombin-Protease (GE Healthcare) abgespalten. Die DH-Domäne von Hot1 verfügt selbst über keine intrinsische Thrombin-Schnittstelle, allerdings verfügt der verwendete Expressionsvektor über (pGEX4T-1) eine Thrombin-Erkennungssequenz. Es wurden 50 U Thrombin-Protease eingesetzt und dem Puffer zusätzlich in einer Endkonzentration 2,5 mM Calciumchlorid zugefügt. Die Proteolyse

erfolgte über eine Zeitdauer von 16 h bei 20°C und wurde durch Zusatz von 1 mM PMSF abgestoppt. Die zugesetzten Substanzen Thrombin und PMSF und das abgespaltene GST wurden mittels einer nachfolgenden Größenausschlusschromatographie entfernt.

### **Größenausschlusschromatographie**

Die Größenausschlusschromatographie oder Gelfiltration dient zur weiteren Aufreinigung des nach der Affinitätschromatographie vorgereinigten Proteins. Definierte Porengrößen im Säulenmaterial, das beispielsweise aus quervernetzter Agarose (Superdex, GE Healthcare) besteht, schließen Proteine mit größeren hydrodynamischen Durchmessers aus und ermöglichen so ein schnelleres Passieren des Säulenmaterials. So wird eine Trennung von Proteinen aufgrund ihrer apparenten Größe ermöglicht. Zur Proteinaufreinigung wurden ausschließlich Superdex 200-Säulen (GE Healthcare) mit einem Säulenbettvolumen von 120 mL verwendet. Bei allen Gelfiltrationsläufen wurde Puffer mit 50mM Tris pH7,5 und 100 mM NaCl verwendet, die Flussrate betrug 1 mL/min bei der präparativen Chromatographie. Die Reinheit der einzelnen Fraktionen wurde mittels SDS-PAGE bestimmt und die sauberen Fraktionen wurden vereinigt.

### **Konzentration von Hot1 durch Ultrafiltration**

Ein notwendiges Ankonzentrieren der Proteinproben vor den Kristallisationsversuchen wurde mittels Ultrafiltration erreicht. Hierzu wurden Amicon-Ultra-Konzentratoren (Millipore) mit einem Fassungsvermögen von 4 oder 15 mL Proteinlösung und einem Ausschlussvolumen von 30 kDa verwendet. Das Ankonzentrieren erfolgte durch Zentrifugieren bei 3500 rpm und 4 °C.

### **Kristallisationsscreening**

Die nachfolgenden Versuche wurden in Kooperation mit Dr. Holger Steuber der AG Essen durchgeführt. Da bisher keine verlässliche Möglichkeit besteht, vorherzusagen unter welchen Bedingungen aus einem bestimmten Protein Kristalle entstehen, werden in einem ersten Schritt eine große Menge an Kristallisationsbedingungen getestet, die bereits zuvor in vielen anderen Fällen zur Proteinkristallbildung geführt haben, die so genannten "sparse-matrix-screens". Es wurden die sparse-matrix-screens EasyXtal Classics Suite, MBClass Suite, MBClass II Suite, JCSG+ Suite, JCSG Core I-IV Suites und der systematische screen PACT Suite (alle QIAGEN) eingesetzt. Alle Ansätze wurden im sitting-drop durchgeführt, einem auf Dampfdiffusion basierenden Verfahren, bei dem die Proteinlösung im Verhältnis eins zu eins mit der Prazipitanslösung gemischt wird und während der Inkubationszeit mit dem Prazipitanslösungsreservoir über die Dampfphase aequilibriert. Es wurden automatisiert 300 nL Proteinlösung mit einer Proteinkonzentration von 10 mg/ml mit 300 nL der jeweiligen Prazipitanslösung in 96 well Innovaplates (Innovadyne) gemischt. Da die verwendete Kristallisationsplatte zwei Vertiefungen für die Aufnahme von Proteintropfen hat, wurde ein Kontrolltropfen nur mit dem Puffer, in dem das Protein gelöst war, gesetzt. Nachdem die Kristallisationsansätze pipettiert waren, wurde die Platte mit einem ViewSeal verschlossen und bei 18°C inkubiert. Die Dokumentation erfolgte manuell an einem Lichtmikroskop oder automatisiert mit Hilfe des Rockimager-Dokumentationssystems (Formulatrix). Kristalle, die für Röntgenbeugungsexperimente brauchbar erschienen, wurden mit

Hilfe von CryoLoops (Hampton Research) unter einem Lichtmikroskop aus Präzipitationslösung entnommen. Die eingefrorenen und gegebenenfalls zuvor gesoakten Kristalle konnten nun für Röntgenbeugungsexperimente verwendet werden. Dazu wurden sie an einem Messplatz der Europäischen Synchrotronstrahleneinrichtung (European Synchrotron Radiation Facility, ESRF) auf einen Goniometerkopf montiert und im Röntgenstrahl ausgerichtet.

## 4.8 Analyse von Proteinen

### 4.8.1 Proteinextraktion aus *U.maydis*

Zur Herstellung von Proteinextrakten aus *U. maydis* wurden 50 ml einer dichten Flüssigkultur zentrifugiert (3500 rpm, 5 min, RT) und das Sediment in 10 ml TBS-Puffer gewaschen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (3500 rpm, 5 min, RT) wurde das Sediment in 500  $\mu$ l TBS aufgenommen und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Der Zellsuspension wurden 0,3 g Glasperlen, 5  $\mu$ l 10 % Triton X-100 und 5  $\mu$ l Protease Inhibitor Cocktail für Pilze (Sigma) zugesetzt und der Ansatz bei -80°C gefroren. Dann wurde das Reaktionsgefäß bei 4°C 30 min auf dem Vibrax geschüttelt. Der Ansatz wurde zentrifugiert (13000 rpm, 10 min, 4°C). Der klare Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Proteinkonzentration bestimmt. Die Langzeitlagerung der Proteine erfolgte bei -80°C.

### 4.8.2 Konzentrationsbestimmung

Die Ermittlung der Proteinkonzentration erfolgte nach Bradford (Bradford, 1976), allerdings in einer modifizierten Form mit Biorad-Reagenz (Biorad). Die Proteinproben wurden auf ein Endvolumen von 100  $\mu$ l um den Faktor 1:10 in TBS verdünnt. 10  $\mu$ l davon wurden mit 990  $\mu$ l der um den Faktor 1:5 verdünnten Biorad-Lösung gemischt. Der Nachweis erfolgte sofort im Photometer bei einer Wellenlänge von 595nm. Zur Standardisierung wurden BSA-Verdünnungsreihen mit definierten Konzentrationen eingesetzt.

### 4.8.3 SDS-Gelelektrophorese

Für die Auftrennung der Proteinextrakte wurden SDS-haltige Polyacrylamidgele genutzt.

Komponente	%	1 M Tris pH8,8	1 M Tris pH6,8	SDS	Aa/Bis 30:0,8	H <sub>2</sub> O	APS	TEMED
Trenn- gel	6	2250 $\mu$ l	-	75 $\mu$ l	1200 $\mu$ l	2400 $\mu$ l	100 $\mu$ l	10 $\mu$ l
Trenn- gel	10	2250 $\mu$ l	-	75 $\mu$ l	2000 $\mu$ l	1600 $\mu$ l	100 $\mu$ l	10 $\mu$ l
Trenn- gel	12	2250 $\mu$ l	-	75 $\mu$ l	2400 $\mu$ l	1200 $\mu$ l	100 $\mu$ l	10 $\mu$ l
Sammel- gel	-	-	375 $\mu$ l	30 $\mu$ l	500 $\mu$ l	2050 $\mu$ l	50 $\mu$ l	7,5 $\mu$ l

Für die Proteingele wurden Mini-Protean 2 Apparaturen (Biorad) verwendet. Die Apparatur wurde nach Herstellerangaben zusammengesetzt, auf ihre Dichtheit überprüft. Zuerst wurde das Trenngel zwischen die Glasplatten gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach dem Auspolymerisieren des Trenngels, wurde der Alkohol vollständig abgenommen, das Sammelgel eingegossen und der Kamm eingesetzt. Nach dem Auspolymerisieren des Sammelgels, wurde der Kamm entfernt, die Taschen sorgfältig gespült und das Gel in die vertikale Laufkammer eingesetzt. Die äußere und die innere Pufferkammer wurden mit Laufpuffer befüllt. Die Proteinproben wurden in TBS auf eine Konzentration von  $2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  verdünnt und je  $10 \mu\text{l}$  dieser Proteinlösung mit  $3 \mu\text{l}$  5x Probenpuffer versetzt. Die Ansätze wurden 5 min zur Denaturierung aufgeköcht, kurz auf Eis heruntergekühlt und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 120 V. Als Größenstandard wurde der Marker "Page Ruler Prestained Protein Ladder" der Firma Fermentas verwendet.

### 4.8.4 Transfer und Nachweis von Proteinen auf PVDF-Membranen (Western Blot)

Die Proteine wurden auf einer PVDF-Membran durch Hybridisierung mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Für den Transfer der Proteine vom SDS-Gel auf eine PVDF (Polyvinylidenfluorid)-Membran (Roth) wurde ein "Wet Blot" durchgeführt. Der Blot wurde auf die Anodenplatte der Blotapparatur aufgeschichtet. Ein in Transferpuffer getränktes Schwämmchen wurden mit zwei Lagen getränktes Blotting-Papier überschichtet. Darauf wurde die, durch Benetzen mit Methanol aktivierte und in Transferpuffer äquilibrierte, PVDF-Membran gelegt. Das Trenngel wurde auf die Membran aufgelegt und mit zwei Lagen in Transferpuffer getränkter Blotting-Papiere und einem weiteren Schwämmchen überschichtet. Die Kathodenplatte wurde aufgesetzt und das Gel eine Stunde bei 30V über Nacht geblottet.

Die Membran wurde in TBST<sub>0,1</sub>-Milch 20 min unter Rotation abgesättigt und in einen Plastikbeutel eingeschweißt. In diesen wurden 10 ml einer 1:400 Verdünnung des primären Antikörpers (GFP mouse monoclonal IgG<sub>2a</sub>, Santa Cruz Biotechnology) in TBST<sub>0,1</sub>-Milch eingefüllt. Der Ansatz wurde über Nacht bei 4°C auf der Wippe inkubiert. Dann wurde die Membran 3x 10 min in 10 ml TBST<sub>0,1</sub> gewaschen und danach mit einer 1:1000 Verdünnung des sekundären Antikörpers (donkey anti-mouse IgG-HRP conjugate, Santa Cruz Biotechnology) in TBST<sub>0,1</sub>-Milch zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

Zum Nachweis der Proteine durch Chemilumineszenz wurde die Membran 3x 10 min in 10 ml TBST<sub>0,1</sub> gewaschen, abgetropft und in eine nach drei Seiten hin offene Plastikhülle gelegt. 0,5 ml der Detektionslösung 1 wurden mit 0,5 ml der Detektionslösung 2 (Amersham) gemischt und auf die Membran aufgetropft. Überschüssige Lösung wurde zu den Seiten hin aus der Plastikhülle gestrichen. Die Membran wurde in ihrer Hülle in eine Röntgenkassette eingelegt, ein Film aufgelegt und der Blot für 15 min in der geschlossenen Kassette exponiert. Dann wurde der Film entwickelt.

Die Membran wurde 1 min in einer Schale Ponceau-S-Lösung (Sigma) gebadet und dann so lange in Wasser entfärbt, bis die Gesamtheit der Proteinbanden auf ihr deutlich sichtbar waren.

#### 4.8.5 Gesamtproteinnachweis durch Anfärben des SDS-Geles

Die Gesamtheit der Proteinbanden wurde durch Anfärben mit Coomassie-Brilliant-blue sichtbar gemacht. Das Gel wurde in die Färbelösung eingelegt und kurz aufgeköcht. Nach dem Abkühlen wurde das Gel so lange in Entfärbelösung entfärbt, bis die Banden deutlich sichtbar waren. Das angefärbte Gel wurde auf ein feuchtes Blotting-Papier gelegt, mit einer Plastikfolie abgedeckt und unter dem Einfluss von Wärme und Druck getrocknet.

#### 4.8.6 Analyse von Protein-Protein-Interaktionen mittels GST *pulldown assays*

##### Beladung von Rho-GTPasen mit Nukleotiden

Um die direkte Interaktion der BAR-Domänen-Proteinen bzw. die Interaktion von Cdc42 mit den BAR-Domänen-Proteinen zu untersuchen, wurden GST *pulldown assays* durchgeführt. Die Überexpression und Aufreinigung erfolgte wie bereits oben beschrieben, allerdings wurden die BAR-Domänen-Proteine nicht mittels einer GST-Säule, sondern mit loser GSH-Agarose gereinigt. Nach der Reinigung wurden die Proteine nicht eluiert, sondern blieben an der GSH-Agarose gebunden. Um eine Interaktion zwischen Cdc42 und den BAR-Domänen Proteinen in Abhängigkeit vom GDP/GTP-Beladungszustand messen zu können, wurden der *U. maydis* Proteinextrakt von Zellen, die GFP-Cdc42 exprimieren mit GDP bzw. GTP beladen. Hierzu wurden dem Zellextrakt einen Überschuss an EDTA (10mM) zugeführt. Hierdurch werden die für die Nukleotidbindung notwendige  $Mg^{2+}$ -Ionen komplexiert und damit das gebundene Nukleotid aus der GTPase gelöst. Um die GTPasen mit dem entsprechenden Nukleotid zu beladen, wurde ein Überschuss dieses Nukleotids (1mM GDP bzw. 100nM GTP $\gamma$ S) zu den nukleotidfreien GTPasen gegeben und für 1h bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde ein Überschuss an Magnesium (25 mM) zugegeben, um das Nukleotid in der GTPase zu stabilisieren.

##### GST *pulldown assay*

Es wurden gleiche Volumina an GSH-Agarose, an die die verschiedenen BAR-Domänen gebunden wurden, mit 500  $\mu$ g Proteinextrakt aus *U. maydis* gemischt und für 1h bei 4°C inkubiert. Anschliessend wurde die GSH-Agarose 5x mit kaltem Waschpuffer (TBS mit 10 mM Magnesium) gewaschen. Die gewaschene GSH-Agarose wurde in SDS-Probenpuffer aufgenommen und für 5 min bei 95°C inkubiert. Interagierende Proteine wurden mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferriert und mittels Western Blot nachgewiesen.

##### GST-CRIB-Prazipitation

Für die CRIB-Prazipitation wurde GSH-Agarose mit aufgereinigtem GST-Ste20-CRIB Protein beladen. Die *U. maydis* Extrakte von Zellen, die die verschiedenen GTPase als GFP-Fusion exprimieren, wurden drei Stunden nach Induktion der Überexpression von Hot1 präpariert. Die geklärten Extrakte mit definierter Proteinkonzentration wurden mit gleichen Mengen GST-CRIB-beladener GSH-Agarose inkubiert (60 min, 4°C). Anschliessend wurde die GSH-Agarose 5x mit kaltem Waschpuffer (TBS mit 10 mM Magnesium) gewaschen. Die gewaschene GSH-Agarose wurde in SDS-Probenpuffer aufgenommen und für 5 min bei 95°C inkubiert. Intera-

gierende Proteine wurden mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferriert und mittels Western Blot nachgewiesen.

### Quantifizierung von Proteinmengen

Zur Quantifizierung der Stärke der HRP-Fluoreszenz bei der Detektion von Proteinen auf PVDF-Membranen, wurden die Signale mit Hilfe einer Chemokamera der Firma INTAS und der zugehörigen Software ChemoStar photographiert. Die Quantifizierung der Signalintensität erfolgte mit dem Programm ImageJ. Dazu wurden die einzelnen Banden mit dem Werkzeug "Rectangular Selections" markiert und der durchschnittliche Grauwert "Mean Gray Value" mit dem Werkzeug "Measure" im Menü "Analyze" bestimmt. Von diesem Wert wurde der gemessene Wert für den Hintergrund des Photos abgezogen. Es fiel auf dass im Falle einer Aktivierung einer GTPase durch Hot1 deren Proteinlevel stark abnahm. Daher wurden parallel zu den CRIB-Präzipitationen auch ein Gesamtproteinextrakt analysiert und die Messwerte für die aktive GTPase gegen die Gesamtmenge der vorhandenen GTPase normalisiert. Für den Gesamtproteinextrakt wurde als Ladekontrolle die Membran mit Ponceau Rot gefärbt, da die üblicherweise benutzte Ladekontrolle Tubulin auf der gleichen Höhe wie die GFP-markierten GTPasen migriert.

## 4.9 *In vitro*-Untersuchung von Rho-Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren

Um die Spezifität von Rho-Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren gegenüber verschiedenen Rho-Proteinen zu bestimmen, wurde ihre Fähigkeit, den Austausch von GDP zu GTP zu katalysieren, *in vitro* analysiert. Zu diesem Zweck werden gereinigte Rho-Proteine mit gereinigten Rho-GTPasen inkubiert und dabei der Austausch von GDP zu GTP gemessen. In dieser Arbeit wurde ein Fluoreszenz-basiertes Testsystem eingesetzt (Neal et al., 1990). Hierzu wurde eine spezifische Eigenschaft des Nukleotid-Analogs 2'(3')-O-(N-Methylanthraniloyl)-GDP (mantGDP) genutzt ( $\lambda_{\text{ex}} = 360 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 440 \text{ nm}$ ). Dieses Nukleotid-Analog hat in wässriger Lösung eine relativ geringe Fluoreszenz. Die Fluoreszenz steigt bei Bindung an eine GTPase stark an. Diese Eigenschaft wird genutzt, um *in vitro* die Beladung der GTPasen mit diesem Nukleotid zu messen. Hierbei wird die GTPase in Anwesenheit eines GEFs und einem Überschuss an mantGDP inkubiert. Ist der GEF in der Lage, den Nukleotidaustausch an der entsprechenden GTPase zu katalysieren, wird das gebundene Nukleotid bevorzugt durch das im Überschuss vorhandene mantGDP ersetzt. Dieser Austausch lässt sich anhand der veränderten Fluoreszenz-Intensität fluorimetrisch messen. Eine parallel durchgeführte Kontrollreaktion ohne GEF erlaubt eine Bestimmung des spontanen Nukleotidaustauschs. Die *in vitro*-Untersuchungen wurden in 96-Well Mikrotiterplatten mit Hilfe eines Tecan Safire Fluorimeters bei 25°C (Tecan, Crailsheim) durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden die jeweiligen GTPasen in GEF-Assay-Puffer, der 400 nM mantGDP enthielt, auf eine Endkonzentration von 1  $\mu\text{M}$  verdünnt. Aus diesem Ansatz wurden je 300  $\mu\text{l}$  für die Mess- und die Kontrollreaktion in eine schwarze 96-Well-Platte (Greiner Bio-One, Frickenhausen) gegeben. Diese Reaktionsansätze wurden zunächst für 5 min inkubiert,

hierbei wurde schon die Fluoreszenz in Abständen von 1 min gemessen. Anschließend wurde gereinigter GEF in einer Endkonzentration von 1  $\mu$ M (wenn nicht anders erwähnt) zugegeben und die Reaktionskinetik für 60 min gemessen. Die gewonnenen Daten wurden gegen die initiale Fluoreszenz normalisiert und mit Hilfe des Programms Microsoft Excel graphisch dargestellt.

## 4.10 Zellbiologische Untersuchung von *U. maydis*

### 4.10.1 Mikroskopie von *U. maydis*-Zellen

Zur Mikroskopie von *U. maydis*-Zellen kam ein Fluoreszenzmikroskop des Typs Axiovert 2 (Zeiss) zum Einsatz. Die Färbungen erfolgten mit den Fluoreszenzfarbstoffen, die in der folgenden Tabelle angegeben sind. Sie wurden (bis auf GFP, mKate, RFP) den Flüssigkulturen in der genannten Endkonzentration zugesetzt. Die Inkubationszeit mit dem Farbstoff reichte von 10 min (CMAC und Calcofluor), bis zu einer Stunde (FM4-64). Die zu untersuchenden Zellen wurden im Volumen von 1,5  $\mu$ l auf einen mit einer ca. 0,5 mm dicken Wasseragarschicht bedeckten Objektträger aufgetropft. Anschließend wurde das Deckglas aufgelegt. Der Wasseragar diente zur Fixierung der Zellen an ihrer Position um unscharfe Bilder zu vermeiden. Zur Anregung der verschiedenen Farbstoffe wurden die zur Wellenlänge passenden Filter genutzt. Vergleichsfotos wurden im Differentialkontrast gemacht und mit einer Kamara der FA Hamamatsu (Typ Orca-ER) dokumentiert. Die Bilder wurden mit dem Programmen Volocity (Improvision) und dem Programm ImageJ bearbeitet.

Name	Zellbestandteil	$\mu$ g/ml Kultur	Excitation	Emission	Farbe
GFP	Fusionsproteine	-	475 nm	509 nm	grün
RFP	Fusionsproteine	-	584 nm	607 nm	rot
mKate	Fusionsproteine	-	588 nm	635 nm	rot
Calcofluor	Glucan	2	350 nm	461 nm	blau
FM4-64	Endozytische Membranen	2	590 nm	640 nm	rot
CMAC	Vakuolen	1	350 nm	466 nm	blau

### Kernfärbung

Für die Kernfärbung mittels DAPI wurden Zellen fixiert. Dazu wurde 1 ml Übernachtskultur bei 5000 rpm für fünf Minuten abzentrifugiert und in 70% Ethanol in 1 x PBS resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen in 1x PBS gewaschen und mit 2  $\mu$ g/ml DAPI gemischt. Die Färbung wurde mit dem DAPI-Filter betrachtet.

### 4.10.2 Zellwandfärbung

Für die Färbung der Zellwand wurden 100  $\mu$ l Zellen einer logarithmisch wachsenden Kultur mit Calcofluor White (2  $\mu$ g/ml) gefärbt, auf einen Objektträger gegeben und mit dem DAPI-Filter betrachtet.

### **Endocytosefärbung**

1 ml Zellen aus einer exponentiell wachsenden Kultur wurden für fünf Minuten bei 4500 rpm abzentrifugiert und in 100  $\mu$ l H<sub>2</sub>O aufgenommen und für fünf Minuten mit 16  $\mu$ M FM4-64 (Vida and Emr, 1995) auf Eis gefärbt. Dann wurde das Volumen auf ein 1 ml aufgefüllt und die Zellen bei 30°C inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Zellen entnommen, auf einen Objektträger gegeben und mit dem Rhodamin-Filter betrachtet.

### **Vakuolenfärbung**

Vakuolen wurden mit CellTracker<sup>TM</sup>blue (CMAC) gefärbt. Hierfür wurde eine bereits mit FM4-64 gefärbt Kultur nach Ablauf von 55 Minuten mit 100  $\mu$ M CMAC versehen und für weitere fünf Minuten inkubiert. Die Zellen wurden mit dem DAPI-Filter betrachtet.

### **Hochauflösende Mikroskopie mittels strukturierter Beleuchtung**

Um mikroskopische Aufnahmen von Hob1-GFP und Hob3-GFP mit Auflösungen unterhalb der Beugungsgrenze zu gewinnen, wurden die Zellen mit Hilfe eines OMX SIM-Mikroskops analysiert (in Zusammenarbeit mit Kay Schink). Bei diesem Mikroskopsystem wird das Präparat mit einem definierten Streifenmuster beleuchtet ("strukturierte Beleuchtung"). Pro Bildebene werden 15 dieser Bilder aufgenommen und anschließend mittels mathematischer Methoden miteinander verrechnet. Das resultierende rekonstruierte Bild weist die doppelte Auflösung eines normalen Lichtmikroskops in allen 3 Dimensionen auf. Dies ermöglicht es somit, auch feine Strukturen zu erkennen.



# Literaturverzeichnis

- Abdul-Manan, N., Aghazadeh, B., Liu, G. A., Majumdar, A., Ouerfelli, O., Siminovitch, K. A. and Rosen, M. K. (1999) Structure of Cdc42 in complex with the GTPase-binding domain of the 'Wiskott-Aldrich syndrome' protein. *Nature*, **399**, 379–83. 0028-0836 Journal Article.
- Abraham, M. T., Kuriakose, M. A., Sacks, P. G., Yee, H., Chiriboga, L., Bearer, E. L. and Delacure, M. D. (2001) Motility-related proteins as markers for head and neck squamous cell cancer. *Laryngoscope*, **111**, 1285–1289.
- Adams, A. E., Johnson, D. I., Longnecker, R. M., Sloat, B. F. and Pringle, J. R. (1990) CDC42 and CDC43, two additional genes involved in budding and the establishment of cell polarity in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol*, **111**, 131–42. 0021-9525 Journal Article.
- Adamson, P., Marshall, C. J., Hall, A. and Tilbrook, P. A. (1992a) Post-translational modifications of p21rho proteins. *J Biol Chem*, **267**, 20033–8. 0021-9258 Journal Article.
- Adamson, P., Paterson, H. F. and Hall, A. (1992b) Intracellular localization of the P21rho proteins. *J Cell Biol*, **119**, 617–27. 0021-9525 Journal Article.
- Altschuler, Y., Liu, S., Katz, L., Tang, K., Hardy, S., Brodsky, F., Apodaca, G. and Mostov, K. (1999) ADP-ribosylation factor 6 and endocytosis at the apical surface of Madin-Darby canine kidney cells. *J Cell Biol*, **147**, 7–12. 0021-9525 Journal Article.
- Alvarez-Tabarés, I. and Pérez-Martín, J. (2010) Septins from the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis* are required for proper morphogenesis but dispensable for virulence. *PLoS One*, **5**, e12933.
- Antonescu, C. N., Aguet, F., Danuser, G. and Schmid, S. L. (2011) Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate regulates clathrin-coated pit initiation, stabilization, and size. *Mol Biol Cell*, **22**, 2588–2600.
- Aspenstrom, P., Lindberg, U. and Hall, A. (1996) Two GTPases, Cdc42 and Rac, bind directly to a protein implicated in the immunodeficiency disorder Wiskott-Aldrich syndrome. *Curr Biol*, **6**, 70–5. 0960-9822 Journal Article.
- Balguerie, A., Sivadon, P., Bonneu, M. and Aigle, M. (1999) Rvs167p, the budding yeast homolog of amphiphysin, colocalizes with actin patches. *J Cell Sci*, **112** ( Pt 15), 2529–2537.
- Banuet, F. and Herskowitz, I. (1989) Different alleles of *Ustilago maydis* are necessary for maintenance of filamentous growth but not for meiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**, 5878–5882.

- Banuett, F. and Herskowitz, I. (1994) Identification of fuz7, a *Ustilago maydis* MEK/MAPKK homolog required for a-locus-dependent and -independent steps in the fungal life cycle. *Genes Dev*, **8**, 1367–1378.
- Banuett, F. and Herskowitz, I. (1996) Discrete developmental stages during teliospore formation in the corn smut fungus, *Ustilago maydis*. *Development*, **122**, 2965–2976.
- Banuett, F. and Herskowitz, I. (2002) Bud morphogenesis and the actin and microtubule cytoskeletons during budding in the corn smut fungus, *Ustilago maydis*. *Fungal Genet Biol*, **37**, 149–170.
- Bell, J. (1989) The polymerase chain reaction. *Immunol Today*, **10**, 351–5. 0167-5699 Journal Article Review Review, Tutorial.
- Böhmer, C., Ripp, C. and Bölker, M. (2009) The germinal centre kinase Don3 triggers the dynamic rearrangement of higher-order septin structures during cytokinesis in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol*, **74**, 1484–1496.
- Bi, F., Debreceeni, B., Zhu, K., Salani, B., Eva, A. and Zheng, Y. (2001) Autoinhibition mechanism of proto-Dbl. *Mol Cell Biol*, **21**, 1463–74. 0270-7306 (Print) Journal Article.
- Birnboim, H. C. and Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, **7**, 1513–1523.
- Bölker, M., Urban, M. and Kahmann, R. (1992) The a mating type locus of *U. maydis* specifies cell signaling components. *Cell*, **68**, 441–450.
- Blood, P. D. and Voth, G. A. (2006) Direct observation of Bin/amphiphysin/Rvs (BAR) domain-induced membrane curvature by means of molecular dynamics simulations. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 15068–15072.
- Bose, I., Irazoqui, J. E., Moskow, J. J., Bardes, E. S., Zyla, T. R. and Lew, D. J. (2001) Assembly of scaffold-mediated complexes containing Cdc42p, the exchange factor Cdc24p, and the effector Cla4p required for cell cycle-regulated phosphorylation of Cdc24p. *J Biol Chem*, **276**, 7176–7186.
- Botelho, R. J. (2009) Changing phosphoinositides "on the fly": how trafficking vesicles avoid an identity crisis. *Bioessays*, **31**, 1127–1136.
- Bourne, H. R. (1997) How receptors talk to trimeric G proteins. *Curr Opin Cell Biol*, **9**, 134–42. 0955-0674 Journal Article Review Review, Tutorial.
- Bourne, H. R., Sanders, D. A. and McCormick, F. (1990) The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. *Nature*, **348**, 125–32. 0028-0836 Journal Article Review Review, Academic.
- Bourne, H. R., Sanders, D. A. and McCormick, F. (1991) The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature*, **349**, 117–27. 0028-0836 Journal Article Review Review, Academic.

- Brachmann, A., König, J., Julius, C. and Feldbrügge, M. (2004) A reverse genetic approach for generating gene replacement mutants in *Ustilago maydis*. *Mol Genet Genomics*, **272**, 216–226.
- Brachmann, A., Weinzierl, G., Kämper, J. and Kahmann, R. (2001) Identification of genes in the bW/bE regulatory cascade in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol*, **42**, 1047–1063.
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **72**, 248–254.
- Brizzio, V., Gammie, A. E. and Rose, M. D. (1998) Rvs161p interacts with Fus2p to promote cell fusion in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol*, **141**, 567–584.
- Brown, J. L., Stowers, L., Baer, M., Trejo, J., Coughlin, S. and Chant, J. (1996) Human Ste20 homologue hPAK1 links GTPases to the JNK MAP kinase pathway. *Curr Biol*, **6**, 598–605. 0960-9822 Journal Article.
- Brugnera, E., Haney, L., Grimsley, C., Lu, M., Walk, S. F., Tosello-Tramont, A.-C., Macara, I. G., Madhani, H., Fink, G. R. and Ravichandran, K. S. (2002) Unconventional Rac-GEF activity is mediated through the Dock180-ELMO complex. *Nat Cell Biol*, **4**, 574–582.
- Butty, A. C., Perrinjaquet, N., Petit, A., Jaquenoud, M., Segall, J. E., Hofmann, K., Zwahlen, C. and Peter, M. (2002) A positive feedback loop stabilizes the guanine-nucleotide exchange factor Cdc24 at sites of polarization. *Embo J*, **21**, 1565–76. 0261-4189 (Print) Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't.
- Cales, C., Hancock, J. F., Marshall, C. J. and Hall, A. (1988) The cytoplasmic protein GAP is implicated as the target for regulation by the ras gene product. *Nature*, **332**, 548–51. 0028-0836 Journal Article.
- Cerione, R. A. (2004) Cdc42: new roads to travel. *Trends Cell Biol*, **14**, 127–132.
- Cestra, G., Kwiatkowski, A., Salazar, M., Gertler, F. and De Camilli, P. (2005) Tuba, a GEF for CDC42, links dynamin to actin regulatory proteins. *Methods Enzymol*, **404**, 537–545.
- Church, G. M. and Gilbert, W. (1984) Genomic sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **81**, 1991–1995.
- Coll, P. M., Rincon, S. A., Izquierdo, R. A. and Perez, P. (2007) Hob3p, the fission yeast ortholog of human BIN3, localizes Cdc42p to the division site and regulates cytokinesis. *EMBO J*, **26**, 1865–1877.
- Coll, P. M., Trillo, Y., Ametzazurra, A. and Perez, P. (2003) Gef1p, a new guanine nucleotide exchange factor for Cdc42p, regulates polarity in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Biol Cell*, **14**, 313–23. 1059-1524 (Print) Journal Article.
- Colot, H. V., Park, G., Turner, G. E., Ringelberg, C., Crew, C. M., Litvinkova, L., Weiss, R. L., Borkovich, K. A. and Dunlap, J. C. (2006) A high-throughput gene knockout procedure for *Neurospora* reveals functions for multiple transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 10352–10357.

- Côté, J.-F. and Vuori, K. (2002) Identification of an evolutionarily conserved superfamily of DOCK180-related proteins with guanine nucleotide exchange activity. *J Cell Sci*, **115**, 4901–4913.
- Das, B., Shu, X., Day, G. J., Han, J., Krishna, U. M., Falck, J. R. and Broek, D. (2000) Control of intramolecular interactions between the pleckstrin homology and Dbl homology domains of Vav and Sos1 regulates Rac binding. *J Biol Chem*, **275**, 15074–15081.
- Dawson, J. C., Legg, J. A. and Machesky, L. M. (2006) Bar domain proteins: a role in tubulation, scission and actin assembly in clathrin-mediated endocytosis. *Trends Cell Biol*, **16**, 493–498.
- Didsbury, J., Weber, R. F., Bokoch, G. M., Evans, T. and Snyderman, R. (1989) rac, a novel ras-related family of proteins that are botulinum toxin substrates. *J Biol Chem*, **264**, 16378–82. 0021-9258 Journal Article.
- Driscoll, P. C. and Vuidepot, A. L. (1999) Peripheral membrane proteins: FYVE sticky fingers. *Curr Biol*, **9**, R857–R860.
- Elliot-Smith, A. E., Mott, H. R., Lowe, P. N., Laue, E. D. and Owen, D. (2005) Specificity determinants on Cdc42 for binding its effector protein ACK. *Biochemistry*, **44**, 12373–12383.
- Erickson, J. W. and Cerione, R. A. (2004) Structural elements, mechanism, and evolutionary convergence of Rho protein-guanine nucleotide exchange factor complexes. *Biochemistry*, **43**, 837–42. 0006-2960 Journal Article Review Review, Tutorial.
- Etienne-Manneville, S. (2004) Cdc42—the centre of polarity. *J Cell Sci*, **117**, 1291–1300.
- Eva, A. and Aaronson, S. A. (1985) Isolation of a new human oncogene from a diffuse B-cell lymphoma. *Nature*, **316**, 273–275.
- Faty, M., Fink, M. and Barral, Y. (2002) Septins: a ring to part mother and daughter. *Curr Genet*, **41**, 123–131.
- Ferguson, K. M., Lemmon, M. A., Schlessinger, J. and Sigler, P. B. (1995) Structure of the high affinity complex of inositol trisphosphate with a phospholipase C pleckstrin homology domain. *Cell*, **83**, 1037–1046.
- Finley, D., Ozkaynak, E. and Varshavsky, A. (1987) The yeast polyubiquitin gene is essential for resistance to high temperatures, starvation, and other stresses. *Cell*, **48**, 1035–46. 0092-8674 Journal Article.
- Freeman, J. L., Abo, A. and Lambeth, J. D. (1996) Rac "insert region" is a novel effector region that is implicated in the activation of NADPH oxidase, but not PAK65. *J Biol Chem*, **271**, 19794–19801.
- Freitag, J., Lanver, D., Böhmer, C., Schink, K. O., Bölker, M. and Sandrock, B. (2011) Septation of infectious hyphae is critical for appressoria formation and virulence in the smut fungus *Ustilago maydis*. *PLoS Pathog*, **7**, e1002044.

- Frieser, S. H., Hlubek, A., Sandrock, B. and Bölker, M. (2011) Cla4 kinase triggers destruction of the Rac1-GEF Cdc24 during polarized growth in *Ustilago maydis*. *Mol Biol Cell*, **22**, 3253–3262.
- Frost, A., Perera, R., Roux, A., Spasov, K., Destaing, O., Egelman, E. H., De Camilli, P. and Unger, V. M. (2008) Structural basis of membrane invagination by F-BAR domains. *Cell*, **132**, 807–817.
- Gao, Y., Xing, J., Streuli, M., Leto, T. L. and Zheng, Y. (2001) Trp(56) of rac1 specifies interaction with a subset of guanine nucleotide exchange factors. *J Biol Chem*, **276**, 47530–41. 0021-9258 Journal Article.
- García-Pedrajas, M. D., Nadal, M., Bölker, M., Gold, S. E. and Perlin, M. H. (2008) Sending mixed signals: redundancy vs. uniqueness of signaling components in the plant pathogen, *Ustilago maydis*. *Fungal Genet Biol*, **45 Suppl 1**, S22–S30.
- Garcia-Mata, R. and Burrridge, K. (2007) Catching a GEF by its tail. *Trends Cell Biol*, **17**, 36–43. 0962-8924 (Print) Journal Article Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't Review.
- Gasman, S., Kalaidzidis, Y. and Zerial, M. (2003a) RhoD regulates endosome dynamics through Diaphanous-related Formin and Src tyrosine kinase. *Nature Cell Biology*, **5**, 195–204.
- Gasman, S., Kalaidzidis, Y. and Zerial, M. (2003b) RhoD regulates endosome dynamics through Diaphanous-related Formin and Src tyrosine kinase. *Nat Cell Biol*, **5**, 195–204.
- Ghomashchi, F., Zhang, X., Liu, L. and Gelb, M. H. (1995) Binding of prenylated and polybasic peptides to membranes: affinities and intervesicle exchange. *Biochemistry*, **34**, 11910–11918.
- Gibbs, J. B., Sigal, I. S., Poe, M. and Scolnick, E. M. (1984) Intrinsic GTPase activity distinguishes normal and oncogenic ras p21 molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **81**, 5704–8. 0027-8424 Journal Article.
- Gladfelter, A. S., Pringle, J. R. and Lew, D. J. (2001) The septin cortex at the yeast mother-bud neck. *Curr Opin Microbiol*, **4**, 681–689.
- Glomset, J. A. and Farnsworth, C. C. (1994) Role of protein modification reactions in programming interactions between ras-related GTPases and cell membranes. *Annu Rev Cell Biol*, **10**, 181–205.
- Gould, G. W. and Lippincott-Schwartz, J. (2009) New roles for endosomes: from vesicular carriers to multi-purpose platforms. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **10**, 287–292.
- Gu, Y., Lin, Q., Childress, C. and Yang, W. (2004) Identification of the region in Cdc42 that confers the binding specificity to activated Cdc42-associated kinase. *J Biol Chem*, **279**, 30507–13. 0021-9258 Journal Article.

- Habermann, B. (2004) The BAR-domain family of proteins: a case of bending and binding? *EMBO Rep*, **5**, 250–255.
- Hall, A. (1990) The cellular functions of small GTP-binding proteins. *Science*, **249**, 635–40. 0036-8075 Journal Article Review Review Literature.
- Hall, A. and Nobes, C. D. (2000) Rho GTPases: molecular switches that control the organization and dynamics of the actin cytoskeleton. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **355**, 965–70. 0962-8436 Journal Article Review Review, Tutorial.
- Hamel, B., Monaghan-Benson, E., Rojas, R. J., Temple, B. R. S., Marston, D. J., Burrridge, K. and Sondek, J. (2011) SmgGDS is a guanine nucleotide exchange factor that specifically activates RhoA and RhoC. *J Biol Chem*, **286**, 12141–12148.
- Hanahan, D., Jessee, J. and Bloom, F. R. (1991) Plasmid transformation of Escherichia coli and other bacteria. *Methods Enzymol*, **204**, 63–113. 0076-6879 (Print) Journal Article Review.
- Hart, M. J., Eva, A., Evans, T., Aaronson, S. A. and Cerione, R. A. (1991) Catalysis of guanine nucleotide exchange on the CDC42Hs protein by the dbl oncogene product. *Nature*, **354**, 311–4. 0028-0836 Journal Article.
- Hart, M. J., Eva, A., Zangrilli, D., Aaronson, S. A., Evans, T., Cerione, R. A. and Zheng, Y. (1994) Cellular transformation and guanine nucleotide exchange activity are catalyzed by a common domain on the dbl oncogene product. *J Biol Chem*, **269**, 62–5. 0021-9258 (Print) Journal Article.
- Hasegawa, H., Kiyokawa, E., Tanaka, S., Nagashima, K., Gotoh, N., Shibuya, M., Kurata, T. and Matsuda, M. (1996) DOCK180, a major CRK-binding protein, alters cell morphology upon translocation to the cell membrane. *Mol Cell Biol*, **16**, 1770–1776.
- Haucke, V. (2005) Phosphoinositide regulation of clathrin-mediated endocytosis. *Biochem Soc Trans*, **33**, 1285–1289.
- Hayakawa, M., Kitagawa, H., Miyazawa, K., Kitagawa, M. and Kikugawa, K. (2005) The FWD1/beta-TrCP-mediated degradation pathway establishes a 'turning off switch' of a Cdc42 guanine nucleotide exchange factor, FGD1. *Genes Cells*, **10**, 241–51. 1356-9597 Journal Article.
- Heo, W. D., Inoue, T., Park, W. S., Kim, M. L., Park, B. O., Wandless, T. J. and Meyer, T. (2006) PI(3,4,5)P3 and PI(4,5)P2 lipids target proteins with polybasic clusters to the plasma membrane. *Science*, **314**, 1458–1461.
- Hinshaw, J. E. and Schmid, S. L. (1995) Dynamin self-assembles into rings suggesting a mechanism for coated vesicle budding. *Nature*, **374**, 190–192.
- Hlubek, A. (2008) *Die selektive Aktivierung der kleinen GTPasen Cdc42 und Rac1 durch Guaninnukleotid-Austauschfaktoren bestimmt deren Signalspezifität in Ustilago maydis*. Ph.D. thesis.

- Hlubek, A., Schink, K. O., Mahlert, M., Sandrock, B. and Bölker, M. (2008) Selective activation by the guanine nucleotide exchange factor Don1 is a main determinant of Cdc42 signalling specificity in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol*, **68**, 615–623.
- Hoffman, G. R. and Cerione, R. A. (2002) Signaling to the Rho GTPases: networking with the DH domain. *FEBS Lett*, **513**, 85–91.
- Huang, T. Y., Renaud-Young, M. and Young, D. (2005) Nak1 interacts with Hob1 and Wsp1 to regulate cell growth and polarity in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Sci*, **118**, 199–210.
- Huber, C., Mårtensson, A., Bokoch, G. M., Nemazee, D. and Gavin, A. L. (2008) FGD2, a CDC42-specific exchange factor expressed by antigen-presenting cells, localizes to early endosomes and active membrane ruffles. *J Biol Chem*, **283**, 34002–34012.
- Hussain, N. K., Jenna, S., Glogauer, M., Quinn, C. C., Wasiak, S., Guipponi, M., Antonarakis, S. E., Kay, B. K., Stossel, T. P., Lamarche-Vane, N. and McPherson, P. S. (2001) Endocytic protein intersectin-1 regulates actin assembly via Cdc42 and N-WASP. *Nat Cell Biol*, **3**, 927–932.
- Hwang, J.-U., Vernoud, V., Szumlanski, A., Nielsen, E. and Yang, Z. (2008) A tip-localized RhoGAP controls cell polarity by globally inhibiting Rho GTPase at the cell apex. *Curr Biol*, **18**, 1907–1916.
- Irazoqui, J. E., Gladfelter, A. S. and Lew, D. J. (2003) Scaffold-mediated symmetry breaking by Cdc42p. *Nat Cell Biol*, **5**, 1062–1070.
- Jack, E. R., Madine, J., Lian, L.-Y. and Middleton, D. A. (2008) Membrane interactions of peptides representing the polybasic regions of three Rho GTPases are sensitive to the distribution of arginine and lysine residues. *Mol Membr Biol*, **25**, 14–22.
- Johnson, D. I. and Pringle, J. R. (1990) Molecular characterization of CDC42, a *Saccharomyces cerevisiae* gene involved in the development of cell polarity. *J Cell Biol*, **111**, 143–52. 0021-9525 Journal Article.
- Kaksonen, M., Toret, C. P. and Drubin, D. G. (2005) A modular design for the clathrin- and actin-mediated endocytosis machinery. *Cell*, **123**, 305–320.
- Kaksonen, M., Toret, C. P. and Drubin, D. G. (2006) Harnessing actin dynamics for clathrin-mediated endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **7**, 404–414.
- Karnoub, A. E., Symons, M., Campbell, S. L. and Der, C. J. (2004) Molecular basis for Rho GTPase signaling specificity. *Breast Cancer Res Treat*, **84**, 61–71.
- Karnoub, A. E., Worthyake, D. K., Rossman, K. L., Pruitt, W. M., Campbell, S. L., Sondek, J. and Der, C. J. (2001) Molecular basis for Rac1 recognition by guanine nucleotide exchange factors. *Nat Struct Biol*, **8**, 1037–1041.

- Kim, A. S., Kakalis, L. T., Abdul-Manan, N., Liu, G. A. and Rosen, M. K. (2000) Autoinhibition and activation mechanisms of the Wiskott-Aldrich syndrome protein. *Nature*, **404**, 151–158.
- Klahre, U. and Kost, B. (2006) Tobacco RhoGTPase ACTIVATING PROTEIN1 spatially restricts signaling of RAC/Rop to the apex of pollen tubes. *Plant Cell*, **18**, 3033–3046.
- Kämper, J., Kahmann, R., Bölker, M., Ma, L.-J., Brefort, T., Saville, B. J., Banuett, F., Kronstad, J. W., Gold, S. E., Müller, O., Perlin, M. H., Wösten, H. A. B., de Vries, R., Ruiz-Herrera, J., Reynaga-Peña, C. G., Snetselaar, K., McCann, M., Pérez-Martín, J., Feldbrügge, M., Basse, C. W., Steinberg, G., Ibeas, J. I., Holloman, W., Guzman, P., Farman, M., Stajich, J. E., Sentandreu, R., González-Prieto, J. M., Kennell, J. C., Molina, L., Schirawski, J., Mendoza-Mendoza, A., Greilinger, D., Münch, K., Rössel, N., Scherer, M., Vranes, M., Ladendorf, O., Vincon, V., Fuchs, U., Sandrock, B., Meng, S., Ho, E. C. H., Cahill, M. J., Boyce, K. J., Klose, J., Klosterman, S. J., Deelstra, H. J., Ortiz-Castellanos, L., Li, W., Sanchez-Alonso, P., Schreier, P. H., Häuser-Hahn, I., Vaupel, M., Koopmann, E., Friedrich, G., Voss, H., Schlüter, T., Margolis, J., Platt, D., Swimmer, C., Gnirke, A., Chen, F., Vysotskaia, V., Mannhaupt, G., Güldener, U., Münsterkötter, M., Haase, D., Oesterheld, M., Mewes, H.-W., Mauceli, E. W., DeCaprio, D., Wade, C. M., Butler, J., Young, S., Jaffe, D. B., Calvo, S., Nusbaum, C., Galagan, J. and Birren, B. W. (2006) Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*. *Nature*, **444**, 97–101.
- Kämper, J., Reichmann, M., Romeis, T., Bölker, M. and Kahmann, R. (1995) Multiallelic recognition: nonself-dependent dimerization of the bE and bW homeodomain proteins in *Ustilago maydis*. *Cell*, **81**, 73–83.
- Knaus, U. G., Wang, Y., Reilly, A. M., Warnock, D. and Jackson, J. H. (1998) Structural requirements for PAK activation by Rac GTPases. *J Biol Chem*, **273**, 21512–21518.
- Kolluri, R., Tolias, K. F., Carpenter, C. L., Rosen, F. S. and Kirchhausen, T. (1996) Direct interaction of the Wiskott-Aldrich syndrome protein with the GTPase Cdc42. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 5615–5618.
- Kost, B. (2008) Spatial control of Rho (Rac-Rop) signaling in tip-growing plant cells. *Trends Cell Biol*, **18**, 119–127.
- Kovacs, E. M., Makar, R. S. and Gertler, F. B. (2006) Tuba stimulates intracellular N-WASP-dependent actin assembly. *J Cell Sci*, **119**, 2715–2726.
- Kozma, R., Ahmed, S., Best, A. and Lim, L. (1995) The Ras-related protein Cdc42Hs and bradykinin promote formation of peripheral actin microspikes and filopodia in Swiss 3T3 fibroblasts. *Mol Cell Biol*, **15**, 1942–52. 0270-7306 Journal Article.
- Kozminski, K. G., Chen, A. J., Rodal, A. A. and Drubin, D. G. (2000) Functions and functional domains of the GTPase Cdc42p. *Mol Biol Cell*, **11**, 339–54. 1059-1524 Journal Article.



- Kozubowski, L., Saito, K., Johnson, J. M., Howell, A. S., Zyla, T. R. and Lew, D. J. (2008) Symmetry-breaking polarization driven by a Cdc42p GEF-PAK complex. *Curr Biol*, **18**, 1719–1726.
- Kreck, M. L., Freeman, J. L., Abo, A. and Lambeth, J. D. (1996) Membrane association of Rac is required for high activity of the respiratory burst oxidase. *Biochemistry*, **35**, 15683–15692.
- Krueger, E. W., Orth, J. D., Cao, H. and McNiven, M. A. (2003) A dynamin-cortactin-Arp2/3 complex mediates actin reorganization in growth factor-stimulated cells. *Mol Biol Cell*, **14**, 1085–1096.
- Kukulski, W., Schorb, M., Kaksonen, M. and Briggs, J. A. G. (2012) Plasma membrane reshaping during endocytosis is revealed by time-resolved electron tomography. *Cell*, **150**, 508–520.
- Kulkarni, K., Yang, J., Zhang, Z. and Barford, D. (2011) Multiple factors confer specific Cdc42 and Rac protein activation by dedicator of cytokinesis (DOCK) nucleotide exchange factors. *J Biol Chem*, **286**, 25341–25351.
- Kwon, M. J., Arentshorst, M., Roos, E. D., van den Hondel, C. A. M. J. J., Meyer, V. and Ram, A. F. J. (2011) Functional characterization of Rho GTPases in *Aspergillus niger* uncovers conserved and diverged roles of Rho proteins within filamentous fungi. *Mol Microbiol*, **79**, 1151–1167.
- Lanning, C. C., Daddona, J. L., Ruiz-Velasco, R., Shafer, S. H. and Williams, C. L. (2004) The Rac1 C-terminal polybasic region regulates the nuclear localization and protein degradation of Rac1. *J Biol Chem*, **279**, 44197–44210.
- Lemmon, M. A., Ferguson, K. M. and Abrams, C. S. (2002) Pleckstrin homology domains and the cytoskeleton. *FEBS Lett*, **513**, 71–6. 0014-5793 (Print) Journal Article Review.
- Leveleki, L., Mahlert, M., Sandrock, B. and Bölker, M. (2004) The PAK family kinase Cla4 is required for budding and morphogenesis in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol*, **54**, 396–406.
- Li, G., D’Souza-Schorey, C., Barbieri, M. A., Roberts, R. L., Klippel, A., Williams, L. T. and Stahl, P. D. (1995) Evidence for phosphatidylinositol 3-kinase as a regulator of endocytosis via activation of Rab5. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 10207–10211.
- Li, R. (1997) Bee1, a yeast protein with homology to Wiscott-Aldrich syndrome protein, is critical for the assembly of cortical actin cytoskeleton. *J Cell Biol*, **136**, 649–658.
- Li, R., Debrececi, B., Jia, B., Gao, Y., Tigyi, G. and Zheng, Y. (1999) Localization of the PAK1-, WASP-, and IQGAP1-specifying regions of Cdc42. *J Biol Chem*, **274**, 29648–54. 0021-9258 Journal Article.
- Liu, X., Wang, H., Eberstadt, M., Schnuchel, A., Olejniczak, E. T., Meadows, R. P., Schkeryantz, J. M., Janowick, D. A., Harlan, J. E., Harris, E. A., Staunton, D. E. and Fesik, S. W. (1998) NMR structure and mutagenesis of the N-terminal Dbl homology domain of the nucleotide exchange factor Trio. *Cell*, **95**, 269–277.

- Longtine, M. S., DeMarini, D. J., Valencik, M. L., Al-Awar, O. S., Fares, H., Virgilio, C. D. and Pringle, J. R. (1996) The septins: roles in cytokinesis and other processes. *Curr Opin Cell Biol*, **8**, 106–119.
- Maesaki, R., Shimizu, T., Ihara, K., Kuroda, S., Kaibuchi, K. and Hakoshima, T. (1999) Biochemical and crystallographic characterization of a Rho effector domain of the protein serine/threonine kinase N in a complex with RhoA. *J Struct Biol*, **126**, 166–170.
- Mahlert, M., Leveleki, L., Hlubek, A., Sandrock, B. and Bolker, M. (2006) Rac1 and Cdc42 regulate hyphal growth and cytokinesis in the dimorphic fungus *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol*, **59**, 567–78. 0950-382X (Print) Journal Article.
- Manser, E., Leung, T., Salihuddin, H., Zhao, Z. S. and Lim, L. (1994) A brain serine/threonine protein kinase activated by Cdc42 and Rac1. *Nature*, **367**, 40–46.
- Marinissen, M. J. and Gutkind, J. S. (2005) Scaffold proteins dictate Rho GTPase-signaling specificity. *Trends Biochem Sci*, **30**, 423–6. 0968-0004 Journal Article.
- McMahon, H. T. and Gallop, J. L. (2005) Membrane curvature and mechanisms of dynamic cell membrane remodelling. *Nature*, **438**, 590–596.
- Menard, L., Tomhave, E., Casey, P. J., Uhing, R. J., Snyderman, R. and Didsbury, J. R. (1992) Rac1, a low-molecular-mass GTP-binding-protein with high intrinsic GTPase activity and distinct biochemical properties. *Eur J Biochem*, **206**, 537–46. 0014-2956 Journal Article.
- Michaelson, D., Silletti, J., Murphy, G., D'Eustachio, P., Rush, M. and Philips, M. R. (2001) Differential localization of Rho GTPases in live cells: regulation by hypervariable regions and RhoGDI binding. *J Cell Biol*, **152**, 111–126.
- Miki, H., Suetsugu, S. and Takenawa, T. (1998) WAVE, a novel WASP-family protein involved in actin reorganization induced by Rac. *Embo J*, **17**, 6932–41. 0261-4189 Journal Article.
- Miki, H., Yamaguchi, H., Suetsugu, S. and Takenawa, T. (2000) IRSp53 is an essential intermediate between Rac and WAVE in the regulation of membrane ruffling. *Nature*, **408**, 732–5. 0028-0836 Journal Article.
- Mionnet, C., Bogliolo, S. and Arkowitz, R. A. (2008) Oligomerization regulates the localization of Cdc24, the Cdc42 activator in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, **283**, 17515–17530.
- Moseley, J. B. and Goode, B. L. (2006) The yeast actin cytoskeleton: from cellular function to biochemical mechanism. *Microbiol Mol Biol Rev*, **70**, 605–645.
- Mott, H. R., Owen, D., Nietlispach, D., Lowe, P. N., Manser, E., Lim, L. and Laue, E. D. (1999) Structure of the small G protein Cdc42 bound to the GTPase-binding domain of ACK. *Nature*, **399**, 384–8. 0028-0836 Journal Article.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. and Erlich, H. (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **51**, 263–73. 0091-7451 Journal Article.

- Neal, S. E., Eccleston, J. F. and Webb, M. R. (1990) Hydrolysis of GTP by p21NRAS, the NRAS protooncogene product, is accompanied by a conformational change in the wild-type protein: use of a single fluorescent probe at the catalytic site. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 3562–5. 0027-8424 (Print) Journal Article.
- Nern, A. and Arkowitz, R. A. (2000) Nucleocytoplasmic shuttling of the Cdc42p exchange factor Cdc24p. *J Cell Biol*, **148**, 1115–1122.
- Nobes, C. D. and Hall, A. (1995) Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell*, **81**, 53–62. 0092-8674 Journal Article.
- Ochoa, G. C., Slepnev, V. I., Neff, L., Ringstad, N., Takei, K., Daniell, L., Kim, W., Cao, H., McNiven, M., Baron, R. and Camilli, P. D. (2000) A functional link between dynamin and the actin cytoskeleton at podosomes. *J Cell Biol*, **150**, 377–389.
- Owen, D., Mott, H. R., Laue, E. D. and Lowe, P. N. (2000) Residues in Cdc42 that specify binding to individual CRIB effector proteins. *Biochemistry*, **39**, 1243–50. 0006-2960 Journal Article.
- Palamidessi, A., Frittoli, E., Garré, M., Faretta, M., Mione, M., Testa, I., Diaspro, A., Lanzetti, L., Scita, G. and Di Fiore, P. P. (2008) Endocytic trafficking of Rac is required for the spatial restriction of signaling in cell migration. *Cell*, **134**, 135–147.
- Park, H.-O. and Bi, E. (2007) Central roles of small GTPases in the development of cell polarity in yeast and beyond. *Microbiol Mol Biol Rev*, **71**, 48–96.
- Park, H. O., Bi, E., Pringle, J. R. and Herskowitz, I. (1997) Two active states of the Ras-related Bud1/Rsr1 protein bind to different effectors to determine yeast cell polarity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 4463–8. 0027-8424 Journal Article.
- Park, H. O., Sanson, A. and Herskowitz, I. (1999) Localization of bud2p, a GTPase-activating protein necessary for programming cell polarity in yeast to the presumptive bud site. *Genes Dev*, **13**, 1912–7. 0890-9369 Journal Article.
- Pasteris, N. G., Buckler, J., Cadle, A. B. and Gorski, J. L. (1997) Genomic organization of the faciogenital dysplasia (FGD1; Aarskog syndrome) gene. *Genomics*, **43**, 390–4. 0888-7543 Journal Article.
- Peter, B. J., Kent, H. M., Mills, I. G., Vallis, Y., Butler, P. J. G., Evans, P. R. and McMahon, H. T. (2004) BAR domains as sensors of membrane curvature: the amphiphysin BAR structure. *Science*, **303**, 495–499.
- Prieto-Sanchez, R. M. and Bustelo, X. R. (2003) Structural basis for the signaling specificity of RhoG and Rac1 GTPases. *J Biol Chem*, **278**, 37916–25. 0021-9258 (Print) Journal Article.
- Pruyne, D. and Bretscher, A. (2000a) Polarization of cell growth in yeast. *J Cell Sci*, **113**, 571–85. 0021-9533 Journal Article Review.

- Pruyne, D. and Bretscher, A. (2000b) Polarization of cell growth in yeast. I. Establishment and maintenance of polarity states. *J Cell Sci*, **113**, 365–75. 0021-9533 Comment Journal Article Review.
- Ren, G., Vajjhala, P., Lee, J. S., Winsor, B. and Munn, A. L. (2006) The BAR domain proteins: molding membranes in fission, fusion, and phagy. *Microbiol Mol Biol Rev*, **70**, 37–120.
- Ridley, A. J. and Hall, A. (1992) The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell*, **70**, 389–99. 0092-8674 Journal Article.
- Ridley, A. J., Paterson, H. F., Johnston, C. L., Diekmann, D. and Hall, A. (1992) The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell*, **70**, 401–10. 0092-8674 Journal Article.
- Riedl, J., Crevenna, A. H., Kessenbrock, K., Yu, J. H., Neukirchen, D., Bista, M., Bradke, F., Jenne, D., Holak, T. A., Werb, Z., Sixt, M. and Wedlich-Soldner, R. (2008) Lifeact: a versatile marker to visualize F-actin. *Nat Methods*, **5**, 605–607.
- Rohatgi, R., Ma, L., Miki, H., Lopez, M., Kirchhausen, T., Takenawa, T. and Kirschner, M. W. (1999) The interaction between N-WASP and the Arp2/3 complex links Cdc42-dependent signals to actin assembly. *Cell*, **97**, 221–231.
- Ron, D., Graziani, G., Aaronson, S. A. and Eva, A. (1989) The N-terminal region of proto-dbl down regulates its transforming activity. *Oncogene*, **4**, 1067–1072.
- Ron, D., Zannini, M., Lewis, M., Wickner, R. B., Hunt, L. T., Graziani, G., Tronick, S. R., Aaronson, S. A. and Eva, A. (1991) A region of proto-dbl essential for its transforming activity shows sequence similarity to a yeast cell cycle gene, CDC24, and the human breakpoint cluster gene, bcr. *New Biol*, **3**, 372–379.
- Rossman, K. L. and Campbell, S. L. (2000) Bacterial expressed DH and DH/PH domains. *Methods Enzymol*, **325**, 25–38.
- Rossman, K. L., Cheng, L., Mahon, G. M., Rojas, R. J., Snyder, J. T., Whitehead, I. P. and Sondek, J. (2003) Multifunctional roles for the PH domain of Dbs in regulating Rho GTPase activation. *J Biol Chem*, **278**, 18393–400. 0021-9258 (Print) Journal Article Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.
- Rossman, K. L., Der, C. J. and Sondek, J. (2005) GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **6**, 167–80. 1471-0072 (Print) Journal Article Review.
- Rossman, K. L., Worthyake, D. K., Snyder, J. T., Cheng, L., Whitehead, I. P. and Sondek, J. (2002a) Functional analysis of cdc42 residues required for Guanine nucleotide exchange. *J Biol Chem*, **277**, 50893–8. 0021-9258 (Print) Journal Article.

- Rossman, K. L., Worthylake, D. K., Snyder, J. T., Siderovski, D. P., Campbell, S. L. and Sondek, J. (2002b) A crystallographic view of interactions between Dbs and Cdc42: PH domain-assisted guanine nucleotide exchange. *Embo J*, **21**, 1315–26. 0261-4189 (Print) Journal Article.
- Routhier, E. L., Burn, T. C., Abbaszade, I., Summers, M., Albright, C. F. and Prendergast, G. C. (2001) Human BIN3 complements the F-actin localization defects caused by loss of Hob3p, the fission yeast homolog of Rvs161p. *J Biol Chem*, **276**, 21670–21677.
- Rudolph, M. G., Bayer, P., Abo, A., Kuhlmann, J., Vetter, I. R. and Wittinghofer, A. (1998) The Cdc42/Rac interactive binding region motif of the Wiskott Aldrich syndrome protein (WASP) is necessary but not sufficient for tight binding to Cdc42 and structure formation. *J Biol Chem*, **273**, 18067–18076.
- Salazar, M. A., Kwiatkowski, A. V., Pellegrini, L., Cestra, G., Butler, M. H., Rossman, K. L., Serna, D. M., Sondek, J., Gertler, F. B. and De Camilli, P. (2003) Tuba, a novel protein containing bin/amphiphysin/Rvs and Dbl homology domains, links dynamin to regulation of the actin cytoskeleton. *J Biol Chem*, **278**, 49031–43. 0021-9258 (Print) Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S. Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **74**, 5463–5467.
- Sasaki, T., Kikuchi, A., Araki, S., Hata, Y., Isomura, M., Kuroda, S. and Takai, Y. (1990) Purification and characterization from bovine brain cytosol of a protein that inhibits the dissociation of GDP from and the subsequent binding of GTP to smg p25A, a ras p21-like GTP-binding protein. *J Biol Chem*, **265**, 2333–7. 0021-9258 Journal Article.
- Schafer, D. A. (2002) Coupling actin dynamics and membrane dynamics during endocytosis. *Curr Opin Cell Biol*, **14**, 76–81.
- Schink, K. O. (2010) *Funktionelle Analyse von Rho-spezifischen Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren in Ustilago maydis*. Ph.D. thesis.
- Schink, K. O. and Bölker, M. (2009) Coordination of cytokinesis and cell separation by endosomal targeting of a Cdc42-specific guanine nucleotide exchange factor in *Ustilago maydis*. *Mol Biol Cell*, **20**, 1081–1088.
- Schmidt, A. and Hall, A. (2002) Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch. *Genes Dev*, **16**, 1587–609. 0890-9369 (Print) Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't Review.
- Schmitz, A. A., Govek, E. E., Bottner, B. and Van Aelst, L. (2000) Rho GTPases: signaling, migration, and invasion. *Exp Cell Res*, **261**, 1–12. 0014-4827 Journal Article Review.
- Schultz, J., Milpetz, F., Bork, P. and Ponting, C. P. (1998) SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 5857–5864.

- Schulz, B., Banuett, F., Dahl, M., Schlesinger, R., Schäfer, W., Martin, T., Herskowitz, I. and Kahmann, R. (1990) The b alleles of *U. maydis*, whose combinations program pathogenic development, code for polypeptides containing a homeodomain-related motif. *Cell*, **60**, 295–306.
- Self, A. J. and Hall, A. (1995) Purification of recombinant Rho/Rac/G25K from *Escherichia coli*. *Methods Enzymol*, **256**, 3–10. 0076-6879 (Print) Journal Article.
- Sharp, P. A., Sugden, B. and Sambrook, J. (1973) Detection of two restriction endonuclease activities in *Haemophilus parainfluenzae* using analytical agarose–ethidium bromide electrophoresis. *Biochemistry*, **12**, 3055–63. 0006-2960 Journal Article.
- Shen, H., Ferguson, S. M., Dephoure, N., Park, R., Yang, Y., Volpicelli-Daley, L., Gygi, S., Schlessinger, J. and De Camilli, P. (2011) Constitutive activated Cdc42-associated kinase (Ack) phosphorylation at arrested endocytic clathrin-coated pits of cells that lack dynamin. *Mol Biol Cell*, **22**, 493–502.
- Shimada, Y., Gulli, M. P. and Peter, M. (2000) Nuclear sequestration of the exchange factor Cdc24 by Far1 regulates cell polarity during yeast mating. *Nat Cell Biol*, **2**, 117–124.
- Shimada, Y., Wiget, P., Gulli, M.-P., Bi, E. and Peter, M. (2004) The nucleotide exchange factor Cdc24p may be regulated by auto-inhibition. *EMBO J*, **23**, 1051–1062.
- Shinjo, K., Koland, J. G., Hart, M. J., Narasimhan, V., Johnson, D. I., Evans, T. and Cerione, R. A. (1990) Molecular cloning of the gene for the human placental GTP-binding protein Gp (G25K): identification of this GTP-binding protein as the human homolog of the yeast cell-division-cycle protein CDC42. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 9853–9857.
- Sikorski, R. S. and Hieter, P. (1989) A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **122**, 19–27.
- Simonsen, A., Wurmser, A. E., Emr, S. D. and Stenmark, H. (2001) The role of phosphoinositides in membrane transport. *Curr Opin Cell Biol*, **13**, 485–492.
- Slepnev, V. I. and Camilli, P. D. (2000) Accessory factors in clathrin-dependent synaptic vesicle endocytosis. *Nat Rev Neurosci*, **1**, 161–172.
- Smaczynska-de Rooij, I. I., Allwood, E. G., Mishra, R., Booth, W. I., Aghamohammadzadeh, S., Goldberg, M. W. and Ayscough, K. R. (2012) Yeast dynamin Vps1 and amphiphysin Rvs167 function together during endocytosis. *Traffic*, **13**, 317–328.
- Small, J. V., Stradal, T., Vignal, E. and Rottner, K. (2002) The lamellipodium: where motility begins. *Trends Cell Biol*, **12**, 112–20. 0962-8924 Journal Article Review Review, Tutorial.
- Snetselaar, Bolker and Kahmann (1996) *Ustilago maydis* Mating Hyphae Orient Their Growth toward Pheromone Sources. *Fungal Genet Biol*, **20**, 299–312.

- Snyder, J. T., Rossman, K. L., Baumeister, M. A., Pruitt, W. M., Siderovski, D. P., Der, C. J., Lemmon, M. A. and Sondek, J. (2001) Quantitative analysis of the effect of phosphoinositide interactions on the function of Dbl family proteins. *J Biol Chem*, **276**, 45868–75. 0021-9258 (Print) Journal Article.
- Snyder, J. T., Worthylake, D. K., Rossman, K. L., Betts, L., Pruitt, W. M., Siderovski, D. P., Der, C. J. and Sondek, J. (2002) Structural basis for the selective activation of Rho GTPases by Dbl exchange factors. *Nat Struct Biol*, **9**, 468–75. 1072-8368 (Print) Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.
- Southern, E. M. (1992) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. 1975. *Biotechnology*, **24**, 122–139.
- Spellig, T., Bottin, A. and Kahmann, R. (1996) Green fluorescent protein (GFP) as a new vital marker in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Mol Gen Genet*, **252**, 503–509.
- Steinberg, G. and Perez-Martin, J. (2008) *Ustilago maydis*, a new fungal model system for cell biology. *Trends Cell Biol*, **18**, 61–67.
- Stewart, A. and Deacon, J. W. (1995) Vital fluorochromes as tracers for fungal growth studies. *Biotech Histochem*, **70**, 57–65.
- Stradal, T. E., Rottner, K., Disanza, A., Confalonieri, S., Innocenti, M. and Scita, G. (2004) Regulation of actin dynamics by WASP and WAVE family proteins. *Trends Cell Biol*, **14**, 303–11. 0962-8924 Journal Article.
- Suetsugu, S., Miki, H. and Takenawa, T. (1999) Identification of two human WAVE/SCAR homologues as general actin regulatory molecules which associate with the Arp2/3 complex. *Biochem Biophys Res Commun*, **260**, 296–302. 0006-291x Journal Article.
- Swanson, J. A. and Watts, C. (1995) Macropinocytosis. *Trends Cell Biol*, **5**, 424–8. 0962-8924 Journal Article.
- Symons, M., Derry, J. M., Karlak, B., Jiang, S., Lemahieu, V., McCormick, F., Francke, U. and Abo, A. (1996) Wiskott-Aldrich syndrome protein, a novel effector for the GTPase CDC42Hs, is implicated in actin polymerization. *Cell*, **84**, 723–34. 0092-8674 Journal Article.
- Takahashi, K., Sasaki, T., Mammoto, A., Takaishi, K., Kameyama, T., Tsukita, S. and Takai, Y. (1997) Direct interaction of the Rho GDP dissociation inhibitor with ezrin/radixin/moesin initiates the activation of the Rho small G protein. *J Biol Chem*, **272**, 23371–23375.
- Takai, S., Hasegawa, H., Kiyokawa, E., Yamada, K., Kurata, T. and Matsuda, M. (1996) Chromosomal mapping of the gene encoding DOCK180, a major Crk-binding protein, to 10q26.13-q26.3 by fluorescence in situ hybridization. *Genomics*, **35**, 403–404.
- Takai, Y., Sasaki, T. and Matozaki, T. (2001) Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev*, **81**, 153–208. 0031-9333 Journal Article Review Review, Tutorial.

- Takei, K., Slepnev, V. I., Haucke, V. and Camilli, P. D. (1999) Functional partnership between amphiphysin and dynamin in clathrin-mediated endocytosis. *Nat Cell Biol*, **1**, 33–39.
- Tarricone, C., Xiao, B., Justin, N., Walker, P. A., Rittinger, K., Gamblin, S. J. and Smerdon, S. J. (2001) The structural basis of Arfaptin-mediated cross-talk between Rac and Arf signalling pathways. *Nature*, **411**, 215–219.
- ten Klooster, J. P. and Hordijk, P. L. (2007) Targeting and localized signalling by small GTPases. *Biol Cell*, **99**, 1–12.
- Thompson, G., Owen, D., Chalk, P. A. and Lowe, P. N. (1998) Delineation of the Cdc42/Rac-binding domain of p21-activated kinase. *Biochemistry*, **37**, 7885–7891.
- Tong, Z., Gao, X.-D., Howell, A. S., Bose, I., Lew, D. J. and Bi, E. (2007) Adjacent positioning of cellular structures enabled by a Cdc42 GTPase-activating protein-mediated zone of inhibition. *J Cell Biol*, **179**, 1375–1384.
- Valencia, A., Chardin, P., Wittinghofer, A. and Sander, C. (1991) The ras protein family: evolutionary tree and role of conserved amino acids. *Biochemistry*, **30**, 4637–4648.
- van Hennik, P. B., ten Klooster, J. P., Halstead, J. R., Voermans, C., Anthony, E. C., Divecha, N. and Hordijk, P. L. (2003) The C-terminal domain of Rac1 contains two motifs that control targeting and signaling specificity. *J Biol Chem*, **278**, 39166–39175.
- Vetter, I. R. and Wittinghofer, A. (2001) The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science*, **294**, 1299–1304.
- Vida, T. A. and Emr, S. D. (1995) A new vital stain for visualizing vacuolar membrane dynamics and endocytosis in yeast. *J Cell Biol*, **128**, 779–792.
- Virag, A., Lee, M. P., Si, H. and Harris, S. D. (2007) Regulation of hyphal morphogenesis by cdc42 and rac1 homologues in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol*, **66**, 1579–1596.
- Wedlich-Soldner, R., Altschuler, S., Wu, L. and Li, R. (2003) Spontaneous cell polarization through actomyosin-based delivery of the Cdc42 GTPase. *Science*, **299**, 1231–1235.
- Weinzierl, G., Leveleki, L., Hassel, A., Kost, G., Wanner, G. and Bolker, M. (2002) Regulation of cell separation in the dimorphic fungus *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol*, **45**, 219–31. 0950-382x Journal Article.
- Welch, M. D., Rosenblatt, J., Skoble, J., Portnoy, D. A. and Mitchison, T. J. (1998) Interaction of human Arp2/3 complex and the *Listeria monocytogenes* ActA protein in actin filament nucleation. *Science*, **281**, 105–108.
- Wennerberg, K. and Der, C. J. (2004) Rho-family GTPases: it’s not only Rac and Rho (and I like it). *J Cell Sci*, **117**, 1301–12. 0021-9533 Journal Article Review Review, Tutorial.



- West, M., Kung, H. F. and Kamata, T. (1990) A novel membrane factor stimulates guanine nucleotide exchange reaction of ras proteins. *FEBS Lett*, **259**, 245–8. 0014-5793 Journal Article.
- West, M. A., Prescott, A. R., Eskelinen, E. L., Ridley, A. J. and Watts, C. (2000) Rac is required for constitutive macropinocytosis by dendritic cells but does not control its downregulation. *Curr Biol*, **10**, 839–48. 0960-9822 Journal Article.
- White, T. J., Arnheim, N. and Erlich, H. A. (1989) The polymerase chain reaction. *Trends Genet*, **5**, 185–9. 0168-9525 Journal Article Review Review, Tutorial.
- Williams, C. L. (2003) The polybasic region of Ras and Rho family small GTPases: a regulator of protein interactions and membrane association and a site of nuclear localization signal sequences. *Cell Signal*, **15**, 1071–1080.
- Worthylake, D. K., Rossman, K. L. and Sondek, J. (2000) Crystal structure of Rac1 in complex with the guanine nucleotide exchange region of Tiam1. *Nature*, **408**, 682–8. 0028-0836 (Print) Journal Article.
- Wu, W. J., Leonard, D. A., A., C. R. and Manor, D. (1997) Interaction between Cdc42Hs and RhoGDI is mediated through the Rho insert region. *J Biol Chem*, **272**, 26153–8. 0021-9258 Journal Article.
- Wu, X., Ramachandran, S., Lin, M.-C. J., Cerione, R. A. and Erickson, J. W. (2011) A minimal Rac activation domain in the unconventional guanine nucleotide exchange factor Dock180. *Biochemistry*, **50**, 1070–1080.
- Zhang, F. L. and Casey, P. J. (1996) Protein prenylation: molecular mechanisms and functional consequences. *Annu Rev Biochem*, **65**, 241–269.
- Ziman, M., Preuss, D., Mulholland, J., O'Brien, J. M., Botstein, D. and Johnson, D. I. (1993) Subcellular localization of Cdc42p, a *Saccharomyces cerevisiae* GTP-binding protein involved in the control of cell polarity. *Mol Biol Cell*, **4**, 1307–16. 1059-1524 Journal Article.
- Zimmerberg, J. and McLaughlin, S. (2004) Membrane curvature: how BAR domains bend bilayers. *Curr Biol*, **14**, R250–R252.

# Abkürzungen

AA	Aminosäure
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BAR	Bin-Amphipysin-Rvs
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
bp	Basenpaare
Cbx	Carboxin
CRIB	Cdc42/Rac1 interactive binding domain
CFP	Cyan-fluoreszierendes Protein <i>cyan fluorescent protein</i>
C-Terminus	Carboxy-Terminus
DH	<i>dbl homology</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	Dithiothreitol
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
dYT	<i>double yeast tryptone</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
et al.	et alteres
FGD1	Fasciogenitale Dysplasie
FYVE	Zink-Finger-Domäne, benannt nach <u>F</u> ab1, <u>Y</u> OTB, <u>V</u> ac1, und <u>E</u> EA1.
GEF	Guaninnukleotidaustauschfaktor ( <i>guanine nucleotide exchange factor</i> )
RhoGEF	RhoGuaninnukleotidaustauschfaktor ( <i>guanine nucleotide exchange factor</i> )
GTP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
GFP	Grün fluoreszierendes Protein ( <i>green fluorescent protein</i> )
GST	Glutathion-S-Transferase
HRP	Meerrettich-Peroxidase
Hyg	Hygromycin
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
LB	<i>Luria Broth</i>
LiT	Lithium-Acetat / Tris

kb	Kilobase
kD	Kilodalton
mant-GDP	N-methylanthranoyl-GDP
m	mili
M	molar
min	Minute
mRNA	<i>messenger</i> RNA
$\mu$	micro
n	nano
N-terminus	Amino-Terminus
Nat	Nourseothricin
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NTP	Nukleotidtriphosphat
OD600	Optische Dichte bei 600 nm
ORF	<i>open reading frame</i>
PAK	p21 aktivierte Kinase
PCR	Polymerasekettenreaktion
pH	negativer dekadischer Logarithmus der $H^+$ -Ionenkonzentration
PH	<i>pleckstrin homology</i>
PD	potato dextrose
PI(3)P	Phosphatidylinositol-3-Phosphat
PtdIns(3)P	Phosphatidylinositol-3-Phosphat
PtdIns(4,5)P <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
PEG	Polyethylenglycol
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RFP	Rot fluoreszierendes Protein ( <i>red fluorescent protein</i> )
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SAP	<i>shrimp alkaline phosphatase</i>
SC	Synthetisches Nährmedium für <i>S. cerevisiae</i> <i>synthetic complete</i>
SCS	Natriumcitrat-Sorbitol-Puffer
SDS	Natriumdodecylsulfat ( <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
STC	Sorbitol-Tris-Kalcium-Puffer
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TAE	Tris/Acetat/EDTA
UV	Ultraviolett
YFP	Gelb fluoreszierendes Protein <i>Yellow fluorescent protein</i>
YEP	<i>yeast extract + peptone</i>
YEPD	<i>yeast extract + peptone + dextrose</i>
YPD	<i>yeast extract + peptone + dextrose</i>

YEPS	<i>yeast extract + peptone + sucrose</i>
YNB	<i>yeast nitrogen base</i>
WT	Wildtyp

# Danksagung

Ich bedanke mich besonders bei Herrn Prof. Dr. Michael Bölker für die Möglichkeit, diese Arbeit in seinem Labor anfertigen zu dürfen und für all die Unterstützung, die er mir dabei bot.

Herrn Prof. Dr. Hans-Ulrich Mösch danke ich, dass er sich bereit erklärte, das Zweitgutachten für diese Arbeit zu übernehmen.

Ich bedanke mich auch bei Prof. Dr. Susanne Önel und Prof. Dr. Martin Thanbichler für die Bereitschaft meiner Prüfungskommission anzugehören.

Der International Max Planck Research School (IMPRS) Marburg danke ich für die finanzielle Unterstützung.

Ein ganz besonderer Dank geht an allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der AG Bölker, bestehend aus: Alex, Alina, Andrea, Anne Marie, Annette, Beate, Björn, Christian, Christopher, Darius, Domenica, Elaine, Esme, Johannes, Julia, Kay, Marisa, Michael M., Michi, Sandra, Silke, Sonja, Stefan, Tobias und Thorsten für die schöne Zusammenarbeit, die gegenseitige Unterstützung und das super Arbeitsklima bedanken. Fühlt euch alle gedrückt!

Ich danke allen Mitgliedern der AG Mösch für die gute Zusammenarbeit, besonders Christof und Christian für die Hilfe beim Mikroskopieren und bei der Chemocam und natürlich Didi, die immer für mich da war.

Marisa Piscator und Hanne Steinebach möchte ich für ihr Organisationstalet danken und dafür, dass sie immer so fürsorglich um alle bemüht sind.

Birgit Niziella und Heide Barbara Böttner möchte ich für all die Hilfe und Unterstützung bei administrativen Herausforderungen danken.

Ein großes Dankeschön auch an Marco aus der AG Buckel, dass er bei all meinen Fragen immer ein offenes Ohr für mich hatte.

Annette, Beate, Christian, Johannes, Kay und Michi möchte ich für die schöne Zeit danken, die wir auch außerhalb des Labors zusammen hatten.

Ein ganz großer Dank geht an Alina und Michi für das Aufspüren von kleinen Unstimmigkeiten in dieser Arbeit und für all die seelische und moralische Unterstützung!

Mein besonderer Dank gilt meinem Freundeskreis und ganz besonders Michi und Tina, die meine kleinen und großen Sorgen geteilt haben, immer für mich da waren und die mir manche Ablenkung vom Laboralltag boten.

Ganz besonders möchte ich mich bei Kay bedanken, der immer für mich da war und ohne den vieles nicht möglich gewesen wäre. Ich möchte mich dafür bedanken, dass er auch in schwierigen Zeiten immer an mich geglaubt hat und mich unterstützt hat.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern und meinem Bruder, die immer für mich da waren, an mich geglaubt haben und mich in allem unterstützt haben.

# Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Britta Anna Maria Tillmann, geboren am 06.07.1982 in Arnsberg, dass ich meine Doktorarbeit mit dem Titel „**Mechanismen der Erkennung der kleinen GTPasen Cdc42 und Rac1 durch Guanin-Nukleotid-Austausch-Faktoren in *U. maydis***“ selbständig und unter ausschließlicher Verwendung der angeführten Hilfsmittel und Quellen angefertigt habe. Die Doktorarbeit wurde in der jetzigen oder ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht.

Marburg/Lahn, 12. Juli 2013

---

Britta Tillmann